

**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
im. Ludwika Hirszfelda
Polska Akademia Nauk**



Mgr inż. Justyna Kutkowska

**„Molekularny mechanizm śmierci komórek
niedrobnokomórkowego raka płuca oraz raka trzustki
traktowanych kombinacją sorafenibu i kwasu betulinowego”**

**(„Molecular mechanism of death of non-small cell lung cancer
cells and pancreatic cancer cells treated with combination of
sorafenib and betulinic acid”)**

**Promotor:
dr hab. Andrzej Rapak**

Praca doktorska wykonana w Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów
Zakładu Onkologii Doświadczalnej

Wrocław, 2019

Składam serdeczne podziękowania, promotorowi, dr hab. Andrzejowi Rapakowi za umożliwienie mi realizacji badań, opiekę merytoryczną, motywację oraz życzliwość.

Prof. dr hab. Leonowi Strządale oraz dr hab. Wojciechowi Kałasowi dziękuję za przekazanie mi swojej wiedzy, cenne wskazówki, uwagi oraz pomoc.

Dr inż. Edycie Wysokińskiej, dr inż. Alicji Pawlak, mgr. Małgorzacie Grudzień oraz Pani mgr. Ewie Ziolo dziękuję za pomoc w realizacji niektórych badań, dzielenie się swoją wiedzą i doświadczeniem oraz za wsparcie.

Koleżankom i Kolegom z Zakładu Onkologii Doświadczalnej oraz wszystkim, którzy choćby w najmniejszym stopniu przyczynili się do powstania tej pracy dziękuję za okazaną mi życzliwość.

Mateuszowi dziękuję za pomoc, wyrozumiałość oraz zachętę do stawiania sobie coraz większych wyzwań.

Moim Rodzicom oraz Rodzeństwu dziękuję za wsparcie i motywację.

Zawartość rozprawy doktorskiej

1. Lista prac wchodzących w skład rozprawy
2. Lista pozostałych prac i patentów, niewchodzących w skład rozprawy
3. Otrzymane stypendia oraz udział w projektach badawczych
4. Streszczenie
5. Abstract
6. Wprowadzenie
 - 6.1. Przedstawienie problemu badawczego
 - 6.2. Metodyka
 - 6.3. Cel naukowy badań oraz ich znaczenie
 - 6.4. Omówienie prac wchodzących w skład rozprawy
7. Omówienie dalszych, nieopublikowanych badań związanych z zaprezentowanym osiągnięciem naukowym
 - 7.1. Badania na liniach pierwotnych raka płuca
 - 7.2. Badania komórek raka płuca w warunkach hipoksji i normoksji
8. Podsumowanie osiągnięcia naukowego
9. Literatura
10. Oświadczenia o udziale procentowym autorów w realizacji poszczególnych prac
11. Prace wchodzące w skład rozprawy

1. Lista prac wchodząca w skład rozprawy

1. **Kutkowska Justyna**; Porębska Irena; Rapak Andrzej; Non-small cell lung cancer-mutations, targeted and combination therapy; *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 2017; 71(0):431-445, IF (2017) 0,783
2. **Kutkowska Justyna**; Strządała Leon; Rapak Andrzej; Synergistic activity of sorafenib and betulinic acid against clonogenic activity of non-small cell lung cancer cells; *Cancer Science*, 2017; DOI: 10.1111/cas.13386, IF (2017) 4,372
3. **Kutkowska Justyna**; Strządała Leon; Rapak Andrzej; Sorafenib in combination with betulinic acid synergistically induces cell cycle arrest and inhibits clonogenic activity in pancreatic ductal adenocarcinoma cells; *Int. J. Mol. Sci.*, 2018; 19, 3234, IF (2018) 4,183

2. Lista pozostałych prac i patentów, niewchodzących w skład rozprawy

1. Pawlak Aleksandra; Ziolo Ewa; **Kutkowska Justyna**; Blazejczyk Agnieszka; Wietrzyk Joanna; Krupa Adriana; Hildebrand Wojciech; Dziegiel Piotr; Dzimira Stanislaw; Obmińska-Mrukowicz Bożena; Strzadala Leon; Rapak Andrzej; A novel canine B-cell leukemia cell line. Establishment, characterization and sensitivity to chemotherapeutics; *Vet Comp Oncol*, 2017; 15, 1218-1231, IF (2017) 2,316
2. Pawlak Aleksandra; **Kutkowska Justyna**; Obmińska-Mrukowicz Bożena; Rapak Andrzej; Methotrexate induces high level of apoptosis in canine lymphoma/leukemia cell lines; *Research in Veterinary Science*, 2017; 114:518-523, IF (2017) 1,698
3. Pawlak Aleksandra; de Miguel Diego; **Kutkowska Justyna**; Obmińska-Mrukowicz Bożena; Rapak Andrzej; Martinez-Lostao Luis; Flavopiridol strongly sensitizes canine lymphoma cells to TRAIL-induced apoptosis; *Anticancer Research*, 2017; 37(12):6655-6665, IF (2017) 1,937
4. Pawlak Aleksandra; Gładkowski Witold; **Kutkowska Justyna**; Mazur Marcelina; Obmińska-Mrukowicz Bożena; Rapak Andrzej; Enantiomeric trans β-aryl-δ-iodo-γ-lactones derived from 2,5-dimethylbenzaldehyde induce apoptosis in canine lymphoma cell lines by downregulation of anti-apoptotic Bcl-2 family members Bcl-xL and Bcl-2; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2018; DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.03.006, IF (2018) 2,802
5. Lisowska Marta, Pawlak Aleksandra, **Kutkowska Justyna**, Hildebrand Wojciech, Ugorski Maciej, Rapak Andrzej, and Miazek Arkadiusz; Development of novel monoclonal antibodies to dog leukocyte antigen DR (DLA-DR) displaying direct and immune-mediated cytotoxicity towards lymphoma cells; *Hematological Oncology*, 2018; DOI: 10.1002/hon.2507, IF (2018) 3,439
6. Mączyńska Justyna, Choromanska Anna, **Kutkowska Justyna**, Kotulska Małgorzata, Zalewski Jerzy, Saczko Jolanta, Kulbacka Julita; Effect of electrochemotherapy with

betulinic acid or cisplatin on regulation of heat shock proteins in metastatic human carcinoma cells in vitro; *Oncology Reports*, 2019; DOI: 10.3892/or.2019.7103, IF (2019) 2,976

7. Henklewska Marta, Pawlak Aleksandra, **Kutkowska Justyna**, Pruchnik Hanna, Rapak Andrzej, Obminska-Mrukowicz Bożena; Comparission of anticancer activity of the novel platinum(ii) complex against canine and human osteosarcoma cell lines; *Vet Comp Oncol*, 2019; DOI: 10.1111/vco.12511, IF (2019) 2,379
8. **Kutkowska Justyna**; Strządała Leon; Rapak Andrzej; Hypoxia increases the apoptotic response to betulinic acid and betulin in human non-small cell lung cancer cells; *Scientific Reports*, 2019; po recenzji, IF (2019) 4,011
9. Lisowska Marta, Milczarek Magdalena, Ciekot Jarosław, **Kutkowska Justyna**, Rapak Andrzej, Miazek Arkadiusz; An antibody specific to dog leukocyte antigen DR (DLA-DR) and its novel methotrexate conjugate inhibit the growth of canine B cell lymphoma; *Cancers*, 2019; po recenzji, IF (2019) 6,072
10. **Zgłoszenie patentowe**: Rapak A, Kutkowska J, et al.: Szczepionka przeciwko zakażeniom cirkowirusowym świń i sposób jej otrzymania. P 422615 (2017)

3. Otrzymane stypendia oraz udział w projektach badawczych

- 1. Laureatka stypendium** dla doktorantów Programu im. Iwanowskiej 2019 Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej NAWA, na wyjazd naukowy
- 2. Laureatka stypendium** dla doktorantów im. Czesław M. Rodkiewicz Scholarship Foundation, na rok akademicki 2018/2019
- 3. Wykonawca projektu badawczego** „Wpływ skojarzonego działania sorafenibu i kwasu betulinowego na komórki niedrobnokomórkowego raka płuca” KNOW 519-1-4-5-130
- 4. Wykonawca zadania** „Badanie wrażliwości linii komórkowych psich białaczek i chłoniaków na indukcję śmierci za pomocą skojarzonego działania czynników antyproliferacyjnych.” w ramach projektu: „Skojarzona indukcja śmierci komórek psich białaczek i chłoniaków” numer **NCN 2011/03/B/NZ5/01533**, finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, w ramach konkursu OPUS
- 5. Wykonawca dwóch zadań** „Opracowanie prototypów antygenów peptydowych PCV2.” oraz „Opracowanie testów diagnostycznych do identyfikacji i monitorowania aktywności immunogennej uzyskanych antygenów PCV2.” w ramach projektu: „Opracowanie i ocena właściwości biologicznych antygenów cirkowirusa świń typu 2 (PCV2) w aspekcie przydatności do produkcji szczepionki i zestawu diagnostycznego” numer **NCBR PBS2/A8/27/2014**, finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju
- 6. Wykonawca czterech zadań** „Otrzymywanie antygeny gp51BLV z hodowli komórkowych.”, „Otrzymywanie poliklonalnych przeciwciał króliczych przeciwko immunoglobulinom bydlęcym i antygenowi gp51.”, „Opracowanie testu paskowego do wykrywania bydlęcych przeciwciał przeciwko BLV.” oraz „Badania walidacyjne oraz stabilności testu.” w ramach projektu: „Opracowanie prostego i szybkiego testu polowego do wykrywania enzootycznej białaczki bydła” numer **NCBR PBS3/B8/20/2015**, finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

7. **Wykonawca trzech zadań** „Zbadanie czystości patentowej pod kątem zastosowania koniugatów metotreksatu w terapii przeciwnowotworowej u psów.”, „Zbadanie efektu cytostatycznego i przeciwnowotworowego koniugatów przeciwciał z metotreksatem in vitro i in vivo na eksperymentalnym modelu mysim.” oraz „Otrzymanie chimerycznych (mysio-psich) pochodnych przeciwciał B5 i E11 do wykorzystania w eksperymentalnej terapii psich chłoniaków i białaczek.” w ramach projektu: „Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w diagnostyce i celowanej terapii przeciwnowotworowej psich białaczek i chłoniaków.” numer **NCN/NCBR TANGO2/340428/NCBR/2017**, finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

4. Streszczenie

Aktualne sposoby leczenia zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC) oraz raka trzustki (PDAC) są ograniczone ze względu na znaczną cytotoksyczność stosowanych chemioterapeutyków. Inhibitory kinaz tyrozynowych wykazały działanie przeciwko określonym szlakom sygnałowym zaangażowanym w procesy onkogenezy, we wszystkich typach nowotworów. Najnowsze badania podkreślają znaczenie skojarzonej, celowanej terapii opartej na sprecyzowanych celach molekularnych. Jedną z najczęstszych mutacji w NSCLC oraz PDAC jest mutacja KRAS aktywująca szlak RAS/RAF/ERK odpowiedzialny za proliferację oraz wskazująca na złe rokowanie. Niestety, mimo wielu badań nadal nie opracowano leczenia celowanego bezpośrednio w nowotwory zależne od onkogenu Ras. Dlatego wiele badań skupia się na opracowaniu czynników hamujących dalsze elementy szlaku, takie jak kinazy Raf. Jednym z takich inhibitorów jest sorafenib.

Celem prezentowanego projektu doktorskiego jest przedstawienie molekularnych mechanizmów współdziałania kombinacji sorafenibu i kwasu betulinowego na cząsteczki sygnałowe oraz na kluczowe czynniki związane ze szlakami proliferacji i apoptozy komórek NSCLC oraz PDAC. Badania wykazały, że kombinacja sorafenibu i kwasu betulinowego znacznie obniża żywotność i proliferację komórek NSCLC, indukuje apoptozę i obniża ich potencjał klonogeny. Analiza szlaków sygnałowych metodą western blotting pokazała zmiany w ekspresji białka CHOP oraz białek biorących udział w mitochondrialnym szlaku apoptozy-Bcl-2 i Bax. Dodatkowo, następuje aktywacja kaspazy-8 i kaspazy-9, trawienie białka PARP oraz zahamowaniem aktywności kinaz Akt i mTOR. Również, ta sama kombinacja związków synergicznie hamuje proliferację i klonogenność komórek PDAC. Mechanizm działania różni się od tego zaobserwowanego w raku płuca. Kombinacja związków hamuje proliferację komórek PDAC poprzez zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2 mocno powiązanego z wzrostem ekspresji białka p21, spadkiem ekspresji białka c-Myc i spadkiem ekspresji cykliny D1 oraz poprzez hamowanie aktywności kinaz ERK1/2 i Akt. Dodatkowo, co jest bardzo ciekawe, kombinacja związków nie indukuje apoptozy w komórkach nowotworowych. Ponadto, badana kombinacja nie wykazuje toksyczności na komórki prawidłowe krwi obwodowej (PBL).

Kombinacja sorafenibu z kwasem betulinowym wydaje się być wysoce efektywna w terapii przeciwko NSCLC, a także przeciwko innym nowotworom, w tym wyjątkowo trudnym do leczenia raku trzustki.

5. Abstract

Current treatments for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) and pancreatic cancer (PDAC) are limited due to the significant cytotoxicity of the chemotherapeutic agents. Tyrosine kinase inhibitors have demonstrated activity against specific signaling pathways involved in oncogenesis processes in all types of tumors. Recent research highlights the importance of combined, targeted therapy based on specific molecular targets. One of the most common mutations in NSCLC and PDAC is the KRAS mutation that activates the RAS/RAF/ERK pathway responsible for proliferation and indicates a poor prognosis. Unfortunately, despite many studies, there is still no direct targeted therapy for Ras-active tumors. Therefore, many studies focus on the development of agents that inhibit further elements of the pathway, such as Raf kinases. One of such inhibitors is sorafenib.

The aim of the presented doctoral project is to present the molecular mechanisms of interaction of the combination of sorafenib and betulinic acid with molecules and key factors associated with proliferation and apoptosis pathways of NSCLC and PDAC cells. Studies have shown that the combination of sorafenib and betulinic acid significantly reduces the viability and proliferation of NSCLC cells, induces apoptosis and reduced the clonogenic potential. Analysis of signaling pathways by western blotting showed changes in CHOP protein expression and proteins involved in the mitochondrial apoptosis-Bcl-2 and Bax pathway. Moreover, caspase-8 and caspase-9 and cleaved PARP appearance, and Akt and mTOR kinase is inhibited. Additionally, the combination of the same compounds synergistically inhibits the proliferation and clonogenicity of PDAC cells. The mechanism of action is different from that observed in lung cancer. The combination of compounds inhibits the proliferation of PDAC cells by the G2 cell cycle arrest strongly associated with increased expression of p21 and decreased expression of c-Myc and cyclin D1 and by inhibiting ERK1/2 and Akt kinases. In addition, which is very interesting, the combination of compounds does not induce apoptosis in cancer cells. Furthermore, the combination does not have toxic effects on normal peripheral blood (PBL) cells.

The combination of sorafenib with betulinic acid is effective in the therapy for NSCLC as well as against other types of cancer, including difficult to treat pancreatic cancer.

6. Wprowadzenie

6.1. Przedstawienie problemu badawczego

Choroby nowotworowe są drugą po chorobach serca przyczyną śmierci w Polsce. Niedrobnokomórkowy rak płuca (NSCLC, ang. non-small cell lung cancer) jest główną przyczyną zgonów spośród wszystkich typów nowotworów, zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet. Z roku na rok zwiększa się liczba zgonów z powodu raka trzustki (PDAC, ang. pancreatic ductal adenocarcinoma) [1]. W 2018 roku na świecie rozpoznano 458 918 nowych przypadków, przy stosunku kobiet do mężczyzn 1:1,37, a w Europie stwierdzono 132 559 nowych przypadków [2]. Nowotwór trzustki jest dwunastym najczęściej występującym nowotworem oraz piątą przyczyną zgonów związanych z rakiem na świecie, jednakże szacuje się, że po 2020 roku PDAC będzie drugą przyczyną śmierci spośród wszystkich typów nowotworów [3]. Występowanie raka trzustki jest 3–4 razy częstsze w krajach wysokorozwiniętych, takich jak: USA, kraje Europy (głównie Środkowej i Północnej) oraz Australia. Styl życia w krajach rozwiniętych, w tym brak aktywności fizycznej i otyłość, palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, czynniki dietetyczne i narażenie zawodowe, mogą odpowiadać za zwiększoną zachorowalność. Dodatkowo, częstość zachorowania na PDAC wzrasta wraz z wiekiem. Blisko 80% pacjentów z rakiem trzustki diagnozowanych jest w wieku między 60 a 80 rokiem życia [4]. Ponadto, w grupie osób po 50-tym roku życia ze świeżo wykrytą cukrzycą stwierdza się zwiększoną częstość występowania nowotworu [5]. Szacuje się, że od 10% aż do 36% przypadków nowotworu trzustki rozwija się na podłożu genetycznym [6]. Dziedziczne zapalenie trzustki spowodowane mutacją w genie PRSS1 podwyższa ryzyko PDAC nawet 70-krotnie. Również, zaobserwowano występowanie tzw. rodzinnych przypadków z bardzo częstymi zachorowaniami na PDAC, w których ryzyko nowotworu w zależności od liczby chorujących krewnych może nawet 32-krotnie przewyższać średnią dla populacji. U 20% tych rodzin stwierdza się mutację w genie BRCA2 [7].

W przypadku nowotworów trzustki największą grupę chorych stanowią pacjenci z zaawansowanym nowotworem, rozpoznany na etapie obecności odległych przerzutów. Ponieważ, przebieg choroby jest bardzo szybki, a średni czas przeżycia od jej rozpoznania wynosi 6 miesięcy, PADAC jest uważany za jeden z najbardziej śmiertelnych nowotworów [4].

Główną przyczyną tak dużej umieralności na nowotwory płuca i trzustki, jest zbyt późne wykrywanie tych nowotworów ze względu na bezobjawowy przebieg wczesnych postaci. Skuteczne leczenie NSCLC oraz PDAC utrudnia także zaawansowany wiek pacjentów i

związane z tym liczne choroby współistniejące uniemożliwiające najskuteczniejsze leczenie radykalne, polegające na resekcji guza lub skojarzeniu chemioterapii i radioterapii [8, 9]. Leczenie zaawansowanych postaci NSCLC oraz PDAC napotyka na duże trudności związane z często występującą opornością na klasyczne leki cytostaticzne. Powyższe fakty powodują, że 5-letnie przeżycie dotyczy jedynie 15% chorych w przypadku NSCLC oraz 8 % w przypadku PDAC [1].

Za podstawową przyczynę rozwoju NSCLC oraz PDAC uważa się palenie tytoniu [10, 11]. Głównym karcynogenem dymu tytoniowego jest benzopiren, który w wyniku reakcji enzymatycznych, ulega w komórce przekształceniu w genotoksyczny epoksyd diolu benzopirenu [12]. Metabolit przyłącza się do DNA stając się mutagenem, powodując powstawanie błędów genetycznych w czasie replikacji sprzyjających transformacji nowotworowej [13]. Choć zaburzenia w budowie podwójnej helisy wywołane przez epoksyd diolu benzopirenu mogą być usunięte przez system naprawy DNA typu wycinanie nukleotydu, to jednak do uruchomienia szlaku naprawczego w tym przypadku dochodzi relatywnie rzadko [10, 14]. Dodatkowo, oddziaływanie pochodnej benzopirenu z DNA na ogół nie blokuje również cyklu komórkowego w fazie G1, jak w przypadku poważnych uszkodzeń chromosomów. W wyniku tych sytuacji dochodzi do replikacji, a synteza nici DNA na matrycy uszkodzonej, związanej z epoksydem diolu benzopirenu, powoduje konwersję nukleotydu G→T [13]. Jeśli do takiej mutacji dojdzie w genach supresorowych nowotworów lub w protoonkogenach, może to spowodować indukcję procesu karcynogenezy [12, 14].

Gruczołak rak trzustki będący najczęstszym nowotworem trzustki (stanowi 90% przypadków) wywodzi się z części zewnątrzwydzielniczej trzustki (odpowiedzialnej za produkcję soku trzustkowego uwalnianego do światła jelita cienkiego) i służącej do trawienia pokarmu. Nowotwór ten charakteryzuje się wytwarzaniem bardzo bogatego podścieliska łącznotkankowego i ubogim unaczynieniem. Ponadto, nacieka na osłonki nerwów oraz naczynia krwionośne i szybko daje przerzuty do węzłów chłonnych. Około 60-70% raków trzustki wywodzi się z głowy trzustki, 5-10% z trzonu i 10-15% z ogona. W 20% nowotwór jest rozprzestrzeniony i obejmuje cały gruczoł [15]. Inne, rzadsze typy nowotworów trzustki to: gruczołakotorbielakorak surowiczy (ang. serous cystadenocarcinoma), nowotwory śluzowe torbielowate (ang. mucinous cystic neoplasm), rak wewnątrzprzewodowy śluzowy brodawkowaty (ang. intraductal papillary mucinous carcinoma), rak z komórek zrazikowych (ang. acinar cell carcinoma) oraz rak pseudobrodawkowaty lity (ang. solid pseudopapillary

carcinoma). Guzy te różnią się od najczęstszego gruczolaka trzustki biologią, rokowaniem oraz czasem postępowaniem leczniczym [16].

Ocena molekularna NSCLC [17] wykazała obecność wielu biomarkerów cząsteczkowych. Geny supresorowe, takie jak p53, TTF1, cytokeratyna 5/6 wykorzystuje się już w diagnostyce różnicowej raka płuca i jego podtypów [18]. Obecnie jednak największe znaczenie mają onkogeny związane z mutacjami dotyczącymi szlaków sygnałowych w komórce. Do najważniejszych należą: mutacja KRAS (25%), EGFR (23%), translokacja kinazy ALK (6%) i mutacja PI3K/Akt (3%) [19]. Obecnie w terapii NSCLC wykorzystuje się głównie inhibitory błonowych kinaz tyrozynowych zapoczątkowujących przekazywanie sygnału do wnętrza komórki. Do leków tego typu należą: erlotynib, gefitynib, które działają przez hamowanie kinazy EGFR i afatynib hamujący receptory rodziny EGFR [20-22] oraz kryzotynib i cerytynib oddziałujące na kinazę ALK [23, 24]. W fazie klinicznej są prowadzone badania nad sorafenibem, inhibitorem Raf [25], sunitynibem, inhibitorami receptorów VEGFR i PDGFR [26] oraz trametynibem, który hamuje receptor MET [27].

Rak trzustki jest chorobą, w której mutacje w genach supresorowych, onkogenach oraz genach mutatorowych prowadzą do nowotworowej transformacji komórek nabłonka gruczołowego przewodów trzustkowych [28]. Mutacje oraz inaktywacje genów supresorowych powodują niestabilność genetyczną i zwiększoną, niekontrolowaną proliferację komórek. Co najmniej 4 geny supresorowe biorą udział w powstawaniu raka trzustki: p16INK4a - pełniący ważną rolę w cyklu komórkowym (do 80%), p53 - odpowiedzialny za indukcję apoptozy i hamowanie angiogenezy (60%), DPC4/SMAD4 - kontrolujący transdukcję sygnału z receptora TGF- β , który wpływa na proliferację, różnicowanie i kontrolę cyklu komórkowego (około 50%) oraz BRCA-2 - odpowiadający za utrzymanie stabilności genetycznej poprzez wpływ na naprawę DNA (7- 10%). Do najczęstszych mutacji w raku trzustki w przypadku onkogenów należą: KRAS (75-100% przypadków), HER-2/neu (30%), Akt-2 (10-20%), COX-2 oraz Notch 1 [29]. Postęp w poznaniu biologii raka trzustki spowodował, że coraz częściej do wyboru terapii oraz określenia kierunku badań klinicznych, wykorzystuje się charakterystykę molekularną komórek nowotworowych.

Jedynym postępowaniem dającym szansę całkowitego wyleczenia raka trzustki pozostaje chirurgiczne usunięcie nowotworu z częścią lub całą trzustką. Jednakże, z powodu

późnego wystąpienia objawów, PDAC najczęściej rozpoznawany jest w IV stopniu zaawansowania klinicznego, uniemożliwia to radykalne leczenie chirurgiczne [4].

Główną przyczyną nieoperacyjności nowotworu jest naciekanie przez guz okolicznych naczyń, spływu żyły wrotnej i samej żyły wrotnej, tętnicy wątrobowej, pnia trzewnego i tętnicy krezkowej górnej. Innymi przeciwwskazaniami do leczenia chirurgicznego są m.in. przerzuty do wątroby, otrzewnej lub innych narządów, w tym węzłów chłonnych nie będących w polu operacyjnym, czy też rozległy naciek guza w przestrzeni zaotrzewnowej [30]. Należy jednak podkreślić, że wielkość guza, a nawet naciekanie przez łączność sąsiadujących narządów, nie dyskwalifikuje od leczenia operacyjnego. W zależności od lokalizacji guza wykonuje się inny typ operacji usunięcia: głowy trzustki (operację Whipple'a lub jej modyfikacje), ogona trzustki (dystalną pankreatektomię) lub całej trzustki (czasem w guzach trzonu trzustki) [31]. Operacje trzustki są poważnymi zabiegami, obciążonymi istotnym odsetkiem powikłań pooperacyjnych (częstość 40%), łącznie z możliwością zgonu. Dodatkowo, odległe wyniki leczenia chirurgicznego raka trzustki pozostają niezadowolające. Mediana przeżycia wynosi kilkanaście miesięcy, a 5-letnie przeżycia należą do rzadkości [32].

Chirurgiczne wycięcie nowotworu trzustki nie jest równoznaczne z jego wyleczeniem. U pacjentów, którzy przeszli radykalną resekcję, dochodzi do nawrotu choroby zarówno w miejscu pierwotnej lokalizacji guza, jak i w odległych narządach. Wznowa raka po operacji zdarza się stosunkowo często, dlatego w celu zwiększenia szans na wyleczenie coraz częściej stosuje się tzw. leczenie uzupełniające, które może mieć miejsce po operacji (tzw. leczenie adjuwantowe) lub przed operacją (leczenie neoadjuwantowe). Dotychczasowe wyniki prób klinicznych z leczeniem neoadjuwantowym nie wskazują na jednoznacznie korzystny wpływ takiego postępowania [33], jednakże coraz więcej publikacji sugeruje pozytywny efekt terapii adjuwantowej. Badania ESPAC-1 przedstawiły istotne wydłużenie spodziewanego 5-letniego przeżycia po podaniu adjuwantowej chemioterapii (5-fluorouracylu (5-FU) z kwasem folinowym) z 11% (bez leczenia) do 29% [34]. Inne badania z gemcytabiną w terapii uzupełniającej wykazały jedynie wydłużenie czasu wolnego od choroby po zastosowaniu tego leku, bez znacznego wpływu na medianę przeżycia i szacowane 5-letnie przeżycie [35].

Z powodu bezobjawowej postaci we wczesnej fazie, rak trzustki najczęściej rozpoznawany jest dopiero w okresie znacznego zaawansowania choroby i tym samym w fazie nieresekcyjności guza, dlatego też u większości pacjentów jedynym możliwym postępowaniem jest leczenie paliatywne. Najważniejszymi chemioterapeutykami stosowanymi w walce z nowotworem trzustki od wielu lat pozostają 5-fluorouracyl (5-FU) i gemcytabina oraz ich kombinacje z innymi lekami, takimi jak: cisplatyna, kapecytabina, doksorubicyna czy erlotinib.

Leczenie może wydłużyć średni czas życia z 3 miesięcy (u nieleczonych) do jedynie 6 miesięcy [36]. U chorych w dobrym stanie ogólnym preferuje się program FOLFIRINOX, który może wydłużyć średni czas przeżycia do 11 miesięcy. Terapia polega na jednoczasowym podawaniu 5-fluorouracylu, leukoworyny, irinotekanu, oxaliplatyny i gemcytabiny. Leczenie wiąże się jednak z licznymi poważnymi efektami ubocznymi (neutropenia, trombocytopenia, neuropatia, biegunki), które stwarzają ryzyko powikłań i obniżają komfort życia [16]. W związku z tym, że wyniki leczenia nadal są niezadowolające, do priorytetowych obszarów badawczych związanych z terapią raka trzustki należy poszukiwanie leków, dla których celem molekularnym będą konkretne geny, których mutacje odpowiadają za rozwój choroby.

Aktualnie, stosowane skojarzenie chemioterapii z leczeniem celowanym w przypadku raka trzustki nie przyniosło zadowalających efektów. W Europie dopuszczono do stosowania wyłącznie skojarzenie gemcytabiny z erlotynibem [37], lecz ma ono umiarkowanie korzystny wpływ na oczekiwaną długość życia. Wysoki koszt ekonomiczny takiego leczenia i nieznacznie większa skuteczność u większości pacjentów stawia pod znakiem zapytania jego rolę w powszechnym użyciu u pacjentów z przerzutującym rakiem trzustki [38]. W fazie klinicznej są prowadzone badania nad kombinacją gemcytabiny z innymi związkami m.in. w fazie III z aksytynibem, II generacji inhibitorem kinazy tyrozynowej VEGFR [39], w fazie III z cetuksymabem, stanowiącym chimeryczne monoklonalne przeciwciało przeciwko EGFR [40] oraz w fazie II z bewacyzumabem, monoklonalnym humanizowanym przeciwciałem anty-VEGF-A [41]. Jednakże, do chwili obecnej badania nie wykazały wydłużenia przeżycia w grupie leczonej kombinacjami związków w porównaniu z gemcytabiną. Również, prowadzone są badania kliniczne nad wykorzystaniem kombinacji immunoterapii z chemioterapią. Niedawno opublikowane badania wykazały obiecujące wyniki w przypadku kombinacji gemcytabiny i nab-paclitaxelu z APX005M, przeciwciałem anty-CD40 oraz nivolumabem, przeciwciałem anty-PD-1 [42].

Klasyczne cytostatyki stosowane obecnie w terapii przeciwnowotworowej mają podobny mechanizm działania i małą swoistość, a stosowane jednocześnie wykazują działanie addytywne przy wielu działaniach niepożądanych. Racjonalne wydają się jednak próby kojarzenia różnych postaci leczenia farmakologicznego. Skojarzenie nowoczesnych metod leczenia farmakologicznego ma również uzasadnienie jako uzupełnienie metod leczenia radykalnego opartego na radioterapii i chirurgii. Skojarzona terapia może być bardziej skuteczna, ponieważ oddziałuje na wiele procesów fizjologicznych (apoptoza, różnicowanie, angiogeneza, przerzutowanie, reakcja układu immunologicznego) oraz pozwala na użycie dużo

mniejszych stężeń związków. Łączenie różnych metod leczenia, w tym opartego na klasycznej chemioterapii i lekach celowanych, pozwala przede wszystkim na przełamanie pierwotnej oporności komórek nowotworowych na pojedyncze leki, a także zmniejsza możliwość nabycia tej oporności. Terapia wielolekowa ogranicza również niekorzystne skutki heterogenności nowotworu. W pracy doktorskiej użyto dwa związki celowane w różne elementy szlaków sygnałowych Ras/MAPK oraz PI3K/Akt.

Sorafenib jest inhibitorem wpływającym na aktywność kinaz tyrozynowych receptorów błonowych VEGFR2 oraz wewnątrzkomórkowych kinaz serynowo-treoninowych elementów szlaku sygnałowego Ras/MAPK [43]. Jako jeden z nielicznych nowych leków celowanych blokuje jednocześnie kinazy błonowe i wewnątrzkomórkowe. Działanie tego typu leków, pozwalające na „zignorowanie” konstytutywnie aktywnego białka Ras może być skuteczne zarówno w pierwotnej terapii, jak i u chorych z nabytą opornością na inhibitory kinaz błonowych. Efekt funkcjonalny sorafenibu w badaniach *in vitro* i *in vivo* wiąże się z działaniem anty-proliferacyjnym, jak i anty-angiogennym [44]. Lek został już zarejestrowany w rakach wątroby, nerki i zróżnicowanym raku tarczycy [45, 46]. W NSCLC trwają obecnie intensywne badania. Uzyskano już obiecujące wyniki badania II fazy pacjentów z zaawansowanym NSCLC (stadium III B lub IV) cechującym się mutacją genu *KRAS* [47, 48]. Również, w fazie II prowadzone są badania z wykorzystaniem kombinacji sorafenibu z gemcytabiną w zaawansowanym stadium PDAC [49, 50]. Jednakże, aktualnie uzyskane wyniki badań nie są obiecujące [51].

Kwas betulinowy (produkt utleniania betuliny) to naturalny związek pochodzenia roślinnego (wykryty głównie w korze brzozy), który wykazuje właściwości anty-proliferacyjne w różnych liniach nowotworowych [52]. Indukcja apoptozy zachodzi poprzez zmiany w błonie mitochondrialnej, aktywację kaspaz, fragmentację DNA [53]. Dodatkowo, związek ten powoduje hamowanie proliferacji komórek nowotworowych poprzez celowanie w szlak sygnałowy PI3K /Akt [54]. W literaturze nie ma wielu informacji na temat wpływu tego związku na komórki NSCLC oraz PDAC [52, 55-57] lecz nowe badania pokazują, iż jest to potencjalny lek przeciwnowotworowy [58].

6.2. Metodyka

- Hodowla komórkowa

Wszystkie linie komórkowe wykorzystane w badaniach hodowane były w warunkach normoksji: 21% tlenu, 5% CO₂, temperatura 37°C (NuAire, Stany Zjednoczone). Komórki hodowano w medium RPMI (IITD, Polska) z 10% zawartością surowicy bydlęcej (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) oraz antybiotykiem antymycotic (AA) (Sigma-Aldrich Chemistry, Stany Zjednoczone). Liczba komórek nakładanych na płytki różniła się w zależności od testu: 5×10³ komórek/0.1 ml (0.32 cm²) (żywołność i proliferacja), 5×10⁴ komórek/0.5 ml (1.9 cm²) (cykl komórkowy i indukcja apoptozy), 5×10⁴ komórek/0.5 ml (1.9 cm²) (test klonogeny) i 3×10⁵ komórek/3 ml (9.5 cm²) (Western blotting). Komórki do doświadczeń wykonywanych w warunkach hipoksji (1% tlenu, 5% CO₂, temperatura 37°C), również hodowano w warunkach normoksji. Po nałożeniu odpowiedniej liczby komórek, 24 godzinnej inkubacji (w celu adhezji komórek do powierzchni płytki) i taktowaniu związkami, płytki przenoszono do inkubatora (Binder, Niemcy) z obniżonym poziomem tlenu. Komórki NSCLC oraz PDAC traktowano sorafenibem (LC Laboratories, Stany Zjednoczone), kwasem betulinowym (Sigma-Aldrich Chemistry, Stany Zjednoczone) i betuliną (Sigma-Aldrich Chemistry, Stany Zjednoczone) po 24 godzinach od nałożenia komórek na płytki.

- Izolacja limfocytów

Próbki krwi zostały rozcieńczone w PBS (ang. phosphate buffered saline) w stosunku 1:1. Następnie mieszaninę bardzo powoli, pojedynczymi kroplami (w celu uniknięcia zmieszania), nawarstwiono na Ficollu-Lymphosep 1.077 g/mL (Biowest, Stany Zjednoczone) oraz całość zwirowano przy ustawieniach 1200 rpm/22°C przez 30 minut. Warstwę limfocytów przeniesiono do czystej probówki i przepłukano trzykrotnie PBS. Komórki PBL przeliczono, zawieszono w medium RPMI z 10% zawartością surowicy bydlęcej i nałożono na płytki do testów.

- Test żywołności i proliferacji

W celu zbadania wpływu traktowania sorafenibem, kwasem betulinowym i betuliną w warunkach normoksji (21% tlenu) i hipoksji (1% tlenu) na żywołność i proliferację komórek NSCLC przeprowadzono test MTS (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Stany Zjednoczone)) oraz test barwienia błękitem trypanu (Trypan blue solution (Bio-Rad, Stany Zjednoczone)). W obu testach komórki inkubowano ze związkami

przez 72 godziny. W teście MTS po 72 godzinnej inkubacji ze związkami, bezpośrednio do komórek dodano odczynnik MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) i inkubowano 1 godzinę. Następnie, za pomocą czytnika płytek Wallac 1420 VICTOR2 plate reader (PerkinElmer, Stany Zjednoczone) zczytano dane przy długości fali 490 nm. W teście z wykorzystaniem błękitu trypanu, komórki zostały trypsynizowane, a następnie zawieszono w nowym medium. Do zawiesiny komórek w stosunku 1:1 dodano błękit trypanu i za pomocą mikroskopu (Olympus IX81), manualnie przeliczono liczbę komórek żywych (komórki martwe kolor niebieski, komórki żywe kolor biały).

- Cykl komórkowy i apoptoza

Sprawdzono wpływ traktowania związkami na zahamowanie cyklu komórkowego oraz indukcję apoptozy. W przypadku cyklu komórkowego, komórki inkubowano ze związkami przez 24 godziny. Po trypsynizacji komórki utrwalono 75% etanolem (POCH, Polska) i inkubowano w temperaturze 4 °C przez 30 minut. Następnie, dodano jodek propidyny (PI, ang. propidium iodide, 50 ng/ml) oraz RNase (0,2mg/ml) (Sigma-Aldrich Chemistry, Stany Zjednoczone) i inkubowano przez noc w ciemnym miejscu w temperaturze 4°C. Dane zostały zczytane za pomocą FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Stany Zjednoczone), a do analizy wyników wykorzystano program ModFit LT5.0 software (Verity Software House, Stany Zjednoczone). W celu zbadania wpływu traktowania związkami na indukcję apoptozy w komórkach, wykorzystano test podwójnego barwienia aneksyną V-FITC (8 µg/ml) (Sigma-Aldrich Chemistry, Stany Zjednoczone) i jodkiem propidyny PI (5 µg/ml). Komórki inkubowano ze związkami przez 72 godziny. Następnie, do zawiesiny komórek po trypsynizacji, dwukrotnym przepłukaniu PBS (zawierającym Ca²⁺, Mg²⁺, 2.5% FBS), dodano aneksynę V-FITC oraz PI, i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej w ciemnym miejscu. Dane zostały zczytane za pomocą FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Stany Zjednoczone), a do analizy wyników wykorzystano program Flowing Software 2.5.1 software (Perttu Terho, Finlandia). Mianem komórek apoptotycznych określono komórki pozytywne dla Aneksyny V oraz dla podwójnego barwienia.

- Western Blot

Zmiany w ekspresji białek po traktowaniu kwasem betulinowym i betulina zostały zmierzone za pomocą testu Western blotting. Lizaty z całych komórek inkubowanych 24 godziny ze związkami, zostały uzyskane przy pomocy buforu RIPA. Lizat komórkowy został poddany sonifikacji (Sonopuls HD 2070; Bandelin, Niemcy) i zwirowany (10000 x g, 10 min,

4 °C). Stężenie białka w lizatach komórkowych zostało zmieżone za pomocą Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Lizat komórkowy wraz z buforem Laemmli sample został podgrzewany przez 5 min w temperaturze 95°C. Białka zostały rozseparowane przy użyciu 10-12% żelu rozdzielającego i przeniesone (transfer pół suchy) na membranę PVDF (0.45 µm; Merck Millipore, Stany Zjednoczone). Membranę blokowano w 1% kazeinie (Sigma-Aldrich Chemistry, Stany Zjednoczone) przez godzinę lub całą noc w 4°C, a następnie inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym anti-HIF-1α (1:1000, #14179; Cell Signaling Technology), anti-p53 (1:1000, #ab26; Abcam), anti-actin/HRP (1:2000, #sc-1615; Santa Cruz Biotechnology) również, całą noc w 4°C. Po godzinnej inkubacji membrany inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem anti-mouse/HRP (1:2000, #P0447; Dako, Denmark) oraz anti-rabbit/HRP (1:2000–3000, #P0048; Dako, Denmark). Związany koniugat wykrywano za pomocą zestawu SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone).

- Test klonogeny

Długoterminowy efekt traktowania komórek NSCLC kwasem betulinowym i betuliną w obu warunkach został zmierzony za pomocą testu klonogenego. Po 72 godzinnej inkubacji ze związkami, komórki zostały trypsynizowane i zawieszono w nowym medium. Komórki przeliczono za pomocą barwienia błękitem trypanu, i następnie 500 żywych komórek zostało nałożonych na nową płytkę z nowym medium. Po 14 dniach inkubacji, komórki utrwalono 1% fioletem krystalicznym (ang. crystal violet) (Sigma-Aldrich Chemistry, Stany Zjednoczone) i zliczano manualnie za pomocą programu ImageJ 1.47 (National Institutes of Health, Stany Zjednoczone).

6.3. Cel naukowy badań oraz ich znaczenie

Praca doktorska skupia się na skojarzonej terapii przeciwnowotworowej, w której badano synergiczny wpływ kombinacji sorafenibu z kwasem betulinowym na uwrażliwienie komórek ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuca oraz raka trzustki na proces śmierci komórkowej.

Celem projektu doktorskiego było zbadanie wpływu traktowania komórek sorafenibem, kwasem betulinowym i kombinacją tych związków na cząsteczki sygnałowe oraz na kluczowe białka związane ze szlakami proliferacji i apoptozy. W projekcie wykorzystano podstawowe metody badań z zakresu biologii molekularnej i komórkowej takie jak pomiar żywotności komórek, proliferacji, zdolności do tworzenia kolonii oraz sposobu indukcji śmierci w komórkach, a także ekspresji wybranych białek pod wpływem działania kombinacji związków na linie komórkowe NSCLC i PDAC oraz na liniach pierwotnych nowotworów płuca, uzyskanych z materiału operacyjnego od pacjentów. Dodatkowo, toksyczność związków i kombinacji sprawdzono na komórkach prawidłowych krwi obwodowej PBL.

Badania przeprowadzone w ramach prezentowanego projektu doktorskiego mogą przyczynić się do skuteczniejszego leczenia NSCLC oraz PDAC, ponieważ pokazujemy, że skojarzone działanie sorafenibu i kwasu betulinowego zwiększa aktywność przeciwnowotworową. Wykazujemy także, że kombinacja niskich stężeń związków daje dużo silniejszy efekt przeciwnowotworowy w porównaniu z pojedynczym traktowaniem, co może pozwolić na użycie niższych dawek leków, a zatem obniżyć skutki uboczne tych chemioterapeutyków. Kombinacja sorafenibu z kwasem betulinowym wydaje się być wysoce efektywna w terapii przeciwko NSCLC, a także potencjalnie przeciwko innym nowotworom, w tym wyjątkowo trudnym do leczenia raku trzustki.

6.4. Omówienie prac wchodzących w skład rozprawy

Publikacja 1 (praca przeglądowa) – Niedrobnokomórkowy rak płuca – mutacje, celowane i skojarzone terapie

Rak płuca jest główną przyczyną zgonów spośród wszystkich typów nowotworów, zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet. Z roku na rok zwiększa się liczba zachorowań na niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), spowodowana głównie paleniem tytoniu. Większość pacjentów umiera z powodu zbyt późnego wykrycia nowotworu. Leczenie pacjentów z zaawansowanym NSCLC utrudnia mała wrażliwość tego nowotworu na cytostatyki oraz współistnienie wielu chorób, których podłożem jest, podobnie jak raka płuca, palenie tytoniu.

Wraz z rozwojem biologii molekularnej, zaczęto wykorzystywać leczenie celowane/skojarzone oddziałujące na określone szlaki sygnałowe zaangażowane w procesy onkogenezy. W artykule opisano mutacje występujące w NSCLC oraz leki stosowane w praktyce klinicznej, jak i będące w fazie badań przedklinicznych.

Najlepiej przebadane i obecnie wykorzystywane w praktyce klinicznej są związki hamujące funkcję receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych. NSCLC cechuje się wieloma mutacjami m.in. EGFR – receptora naskórkowego czynnika wzrostu i mutacją KRAS. Rzadko spotykaną, ale istotną klinicznie jest rearanżacja genu ALK. W leczeniu chorych z NSCLC stosuje się wiele inhibitorów receptora EGFR, takich jak erlotynib, gefitynib, afatynib oraz dwa związki celowane w kinazę ALK krizotynib i cerytynib. Niestety, mimo licznych badań klinicznych, w dalszym ciągu nie można poprawić skuteczności leczenia pacjentów z mutacją KRAS.

W literaturze opisano wiele przykładów skojarzonego traktowania komórek NSCLC. Najefektywniejszym rozwiązaniem byłoby skojarzenie niektórych związków wykazujących synergistyczne działanie na komórki nowotworowe. Niektóre kombinacje związków są już w badaniach klinicznych. Większa część prób dotyczy połączenia inhibitorów kinaz tyrozynowych z innego typu inhibitorami farmakologicznymi lub immunoterapią.

Publikacja 2 (praca oryginalna) – Synergiczny wpływ sorafenibu i kwasu betulinowego przeciw klonogennej aktywności komórek niedrobnokomórkowego raka płuca

W pracy opisano molekularny mechanizm współdziałania sorafenibu i kwasu betulinowego na proces śmierci komórek nowotworowych NSCLC, posiadających różne mutacje genu *KRAS*: A549 (G12S), A427 (G12C) i H385 (G12D).

Badania wykazały, że kombinacja sorafenibu i kwasu betulinowego znacznie obniża żywotność i proliferację komórek NSCLC, indukuje apoptozę i obniża ich potencjał klonogeny. Analiza szlaków sygnałowych metodą western blotting pokazała zmiany w ekspresji białka CHOP, aktywowanego w wyniku stresu w retikulum endoplazmatycznym, którego nadekspresja indukuje apoptozę oraz białek biorących udział w mitochondrialnym szlaku apoptozy - spadek ekspresji anti-apoptotycznego białka Bcl-2 i wzrost ekspresji pro-apoptotycznego białka Bax. Dodatkowo, komórki traktowane sorafenibem i kwasem betulinowym indukują apoptozę poprzez aktywację kaspazy-8 i kaspazy-9 oraz poprzez trawienie białka PARP. Kombinacja związków synergicznie hamuje proliferację w komórkach NSCLC. Efekt ten może być powiązany z zahamowaniem aktywności kinaz Akt i mTOR.

Wcześniejsze badania dowiodły, iż kwas betulinowy i jego pochodne nie wykazuje toksyczności w badaniach *in vitro*: nie zaobserwowano zmian w ogólnym stanie zwierząt oraz zaburzeń hematologicznych [59]. Ponadto, inne badania potwierdziły, brak toksycznego wpływu kwasu betulinowego na komórki prawidłowe oraz na komórki prawidłowe krwi obwodowej (PBL, ang. peripheral blood lymphocytes) [60]. Ze względu na potencjalnie toksyczny efekt związków na komórki krwi po podaniu dożylnym, sprawdzono wpływ kombinacji sorafenibu i kwasu betulinowego na prawidłowe komórki prawidłowe PBL. Komórki wyizolowano z krwi trzech pracowników laboratorium. Badania wykazały, iż liczba komórek PBL po traktowaniu sorafenibem, kwasem betulinowym i kombinacją nie obniżyła się oraz nie zaobserwowano indukcji apoptozy.

Mechanizmy hamowania wzrostu komórek przez związki zwykle są charakteryzowane przy użyciu krótkoterminowych testów. W pracy przeprowadzono długoterminowy test aktywności komórek klonogennych. Traktowanie komórek A549, H358 i A427 sorafenibem i kwasem betulinowym znacząco zmniejsza ich potencjał klonogeny w porównaniu do komórek traktowanych każdym z tych związków osobno. Zdolność klonogenna komórek nowotworowych jest powiązana ze zdolnościami do proliferacji i samo odnawiania, które

związane są z rozwojem nowotworu. Badanie komórek klonogennych przyczynia się do identyfikacji celów molekularnych ważnych w skutecznej terapii przeciwnowotworowej.

W publikacji wykazano, iż niskie dawki sorafenibu lub kwasu betulinowego nie są cytotoksyczne, nie wpływają na cykl komórkowy i nie indukują apoptozy oraz nie wpływają na potencjał klonogeny w komórkach NSCLC, natomiast w połączeniu wykazują synergiczny anty-proliferacyjny i pro-apoptyczny efekt oraz silnie obniżają potencjał klonogeny. Ponadto, kombinacja sorafenibu z kwasem betulinowym działa skutecznie niezależnie od rodzaju mutacji KRAS w komórkach.

Publikacja 3 (praca oryginalna) – Kombinacja sorafenibu i kwasu betulinowego synergicznie hamuje cykl komórkowy oraz obniża potencjał klonogeny komórek raka trzustki

Najczęstszą mutacją w raku trzustki jest mutacja KRAS, występująca w 90% przypadków. Niemal wszystkie badania celujące bezpośrednio w mutację KRAS nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Co raz częściej, najnowsze badania skupiają się na opracowaniu kombinacji związków celujących w dalsze elementy szlaku sygnałowego Ras, w kinazę MAPK oraz szlak PI3K/Akt.

W pracy, linie komórkowe PDAC, dwie z mutacją KRAS: AsPC-1 (G12D) i Capan-1 (G12V) oraz linię z mutacją BRAF: BxPC-3 (V487-P492>A), traktowano sorafenibem, kwasem betulinowym i kombinacją tych związków. Zbadano wpływ związków na żywotność, proliferację, indukcję apoptozy, szlaki sygnałowe oraz potencjał klonogeny.

Badania wykazały, iż kombinacja sorafenibu i kwasu betulinowego znacznie obniża żywotność i proliferację linii komórkowych PDAC. Kombinacja związków hamuje proliferację komórek PDAC poprzez zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2 mocno powiązanego z wzrostem ekspresji białka p21, spadkiem ekspresji białka c-Myc i spadkiem ekspresji cykliny D1. Dodatkowo, kombinacja synergicznie hamuje elementy szlaków sygnałowych PI3K/Akt i MAPK. Przypuszczamy, że blokowanie tych dwóch szlaków powoduje zahamowanie proliferacji komórek PDAC. Ponadto, co ciekawe kombinacja nie indukuje apoptozy w komórkach raka trzustki. Co najważniejsze, leczenie skojarzone sorafenibem i kwasem betulinowym znacznie zmniejszyło zdolność tworzenia kolonii komórek PDAC.

Podsumowując, po raz pierwszy wykazano, iż kombinacja sorafenibu z kwasem betulinowym obniża żywotność, proliferację, hamuje cykl komórkowy i obniża potencjał klonogeny komórek PDAC. Dodatkowo, kombinacja synergicznie hamuje fosforylację kinazy Akt i ERK1/2. Otrzymane wyniki mogą dostarczyć wiedzy na temat nowej skojarzonej terapii przeciwko raku trzustki.

7. Omówienie dalszych, nieopublikowanych badań związanych z zaprezentowanym osiągnięciem naukowym

7.1 Badania na liniach pierwotnych raka płuca

Hodowle *in vitro* umożliwiają zidentyfikowanie i ustalanie linii komórkowych raka płuca, co doprowadziło do lepszego, zrozumienia biologii nowotworów. Jednakże ustalone linie komórkowe często nie są reprezentatywne dla szeregu różnych typów i heterogennej populacji komórek guza nowotworowego [61]. Guz nowotworowy, oprócz komórek nowotworowych, składa się z wielu innych rodzajów komórek: fibroblastów, nabłonków, śródbłonek naczyń krwionośnych, a także licznych komórek układu odpornościowego, które wspólnie nazywane są mikrośrodowiskiem nowotworu [62].

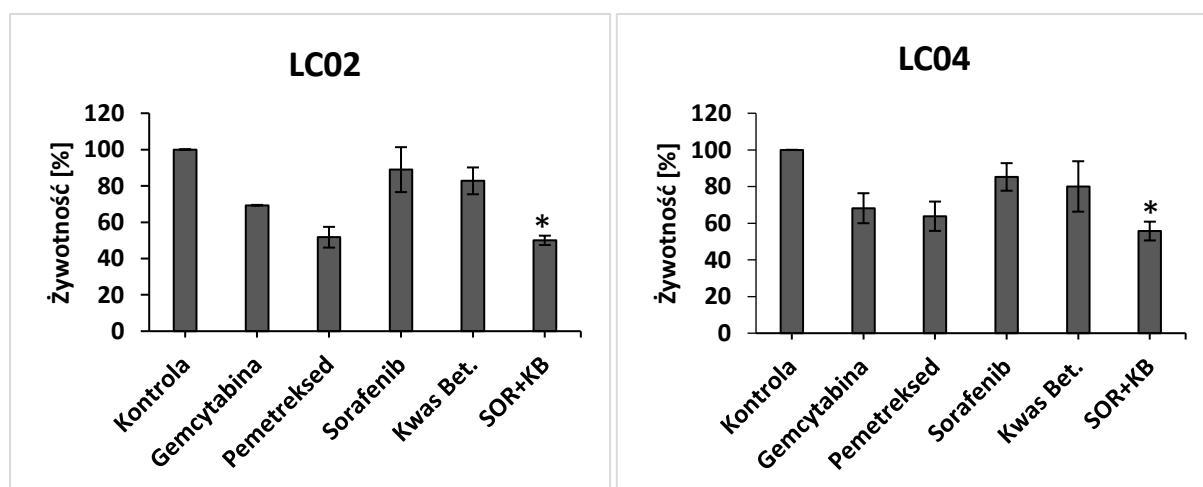
W tej części projektu zostały przeprowadzone badania na liniach pierwotnych nowotworu płuca, otrzymanych z guzów od pacjentów (zgoda Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, Opinia Nr KB-21/2018 z dnia 30.01.2018). Podczas operacji resekcji guza w Klinice Pulmonologii i Nowotworów Płuca Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu część nowotworu została umieszczona w medium RPMI z 10% zawartością surowicy bydlęcej i w ciągu 1 godziny przetransportowana do Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów. Guz przemyto zimnym PBS. Następnie, został pocięty na mniejsze kawałki i roztarty za pomocą filtra membranowego. Roztarty nowotwór wraz z medium przeniesiono do próbki i odwirowano przy 1400 rpm przez 5 minut. Następnie, komórki zawieszono w nowym medium i nałożono na płytki do testów.

Tabela 1. Linie pierwotne użyte w doświadczeniach.

Nazwa	Typ histologiczny	Podtyp histologiczny	Wiek	Płeć
LC02	NSCLC	AC	73	K
LC04	NSCLC	SCC	65	M

AC – Gruczolakorak (ang. Adenocarcinoma), SCC - Rak płaskonabłonkowy (ang. Squamous cell carcinoma)

W celu zbadania wpływu sorafeniibu, kwasu betulinowego i kombinacji na linie pierwotne raka płuca, komórki potraktowano wyżej wymienionymi związkami i po 72 godzinach, za pomocą testu MTS sprawdzono żywotność komórek (Rysunek 1). Dodatkowo, komórki traktowano dwoma cytostatykami stosowanymi powszechnie w zaawansowanym stadium NSCLC - gemcytabiną i pemetreksedem. Zaobserwowano, iż kombinacją związków obniża żywotność komórek nowotworowych. Cytotoksyczność kombinacji jest na podobnym poziomie do cytostatyków w dużym toksycznym dla człowieka stężeniu.



Rysunek 1. Kombinacja sorafeniibu i kwasu betulinowego obniża żywotność komórek lini pierwotnych raka płuca. Komórki LC02 i LC04 traktowano gemcytabiną (10 μ M), pemetreksedem (1 μ M), sorafeniibem (5 μ M) i kwasem betulinowym (6 μ M). Żywotność komórek mierzono po 72 godz. za pomocą testu MTS (n=3). *p<0.05 porównując z komórkami traktowanymi sorafeniibem oraz kwasem betulinowym.

Ze względu na znaczną cytotoksyczność stosowanych obecnie chemioterapeutyków, zastosowanie w leczeniu zaawansowanego NSCLC kombinacji sorafeniibu i kwasu betulinowego, może zaowocować lepszymi wynikami przy zminimalizowaniu groźnych objawów niepożądanych.

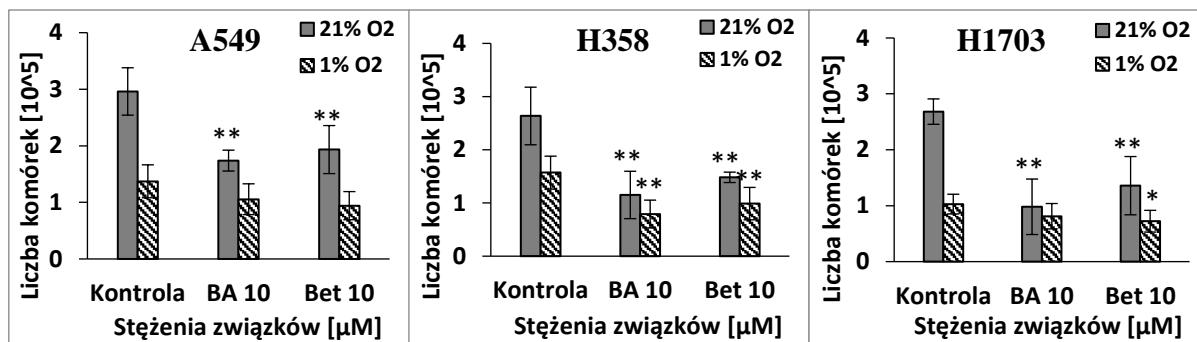
Z powodu niskiej żywotności komórek nowotworowych nie udało się zrobić więcej doświadczeń. Podczas wykonywania tej części projektu otrzymano więcej próbek, ale tylko z dwóch udało się otrzymać żywotną zawiesinę komórek.

7.2 Badania komórek raka płuca w warunkach hipoksji i normoksji

Mechanizm chemiooporności nowotworu jest bardzo złożony. Mikrośrodowisko niedotlenienia (hipoksja, redukcja tlenu <1%) potencjalnie odgrywa kluczową rolę w tym procesie. Niedotlenienie w guzach litych, w tym NSCLC, jest negatywnym czynnikiem prognostycznym [63]. Kwas betulinowy i betulina są to związki bardzo często używane w badaniach przeciwnowotworowych, jednakże ich mechanizm działania jest wciąż dokładnie nieznan [64]. Wykazano, iż kwas betulinowy zwiększa swoją cytotoksyczność w warunkach hipoksji w nowotworach takich jak glejak i rak prostaty [65, 66].

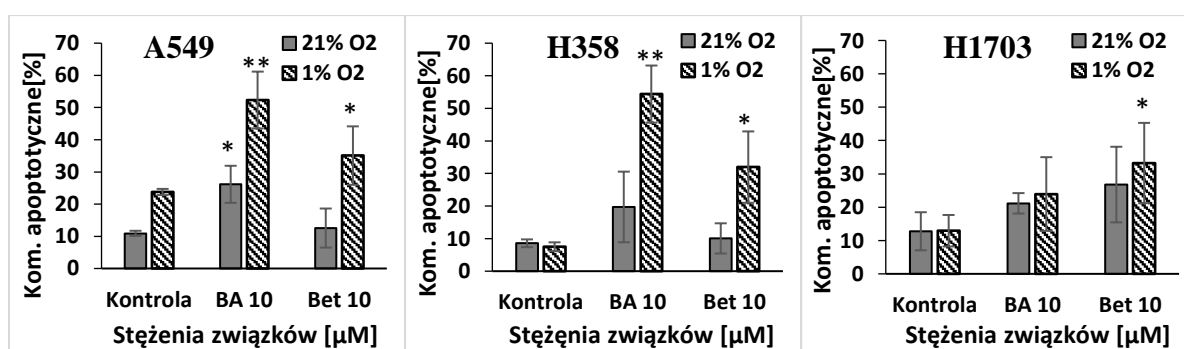
W pracy, komórki NSCLC: A549, H358 i H1703 traktowano kwasem betulinowym i betulina. Zbadano wpływ tych związków na żywotność, proliferację, indukcję apoptozy, cykl komórkowy, szlaki sygnałowe i potencjał klonogeny w warunkach normoksji (21% tlenu) i hipoksji (1% tlenu).

Otrzymane wyniki wykazały, iż traktowanie związkami obniża żywotność i proliferację komórek NSCLC (Rysunek 2). Kwas betulinowy i betulina znacząco obniżyły liczbę komórek w warunkach normoksji do: $1.7 \pm 0.2 \cdot 10^5$ i $1.9 \pm 0.4 \cdot 10^5$ w linii komórkowej A549, $1.1 \pm 0.4 \cdot 10^5$ i $1.4 \pm 0.1 \cdot 10^5$ w linii komórkowej H358, $0.9 \pm 0.4 \cdot 10^5$ i $1.3 \pm 0.5 \cdot 10^5$ w lini komórkowej H1703 ($p < 0.01$). Liczba komórek w warunkach hipoksji znacząco obniżyła się po traktowaniu betulina w linii komórkowej A549 do $0.9 \pm 0.2 \cdot 10^5$ i linii komórkowej H1703 do $0.7 \pm 0.2 \cdot 10^5$ ($p < 0.05$) oraz po traktowaniu kwasem betulinowym i betulina w linii komórkowej H358 do $0.8 \pm 0.2 \cdot 10^5$ i $0.9 \pm 0.3 \cdot 10^5$ ($p < 0.01$). Anty-proliferacyjny efekt w warunkach normoksji powiązany jest z zahamowaniem cyklu w fazie G1 wraz ze wzrostem ekspresji białka p21 oraz spadkiem ekspresji cykliny D1 i cykliny B1. Inne badania potwierdzają zdolność do hamowania różnicowania poprzez zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G1 po traktowaniu kwasem betulinowym w liniach komórkowych czerniaka [67]. Również, zaobserwowano zmiany w ekspresji białek powiązanych z cyklem komórkowym po traktowaniu kwasem betulinowym w warunkach hipoksji, jednakże niezaobserwowano znaczących zmian w analizie cyklu komórkowego.



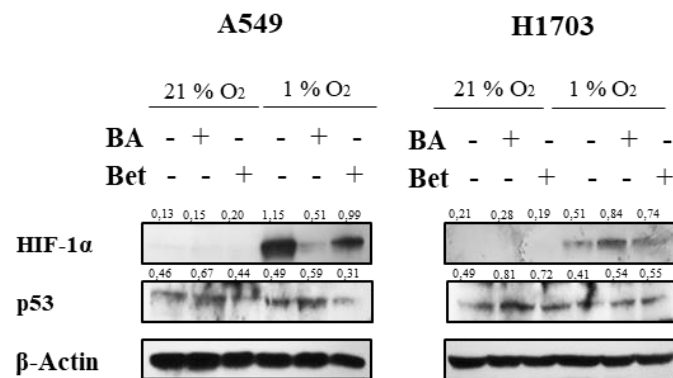
Rysunek 2. Traktowanie kwasem betulinowym i betuliną obniża liczbę komórek NSCLC w warunkach normoksji i hipoksji. Komórki A549, H358 i H1703 traktowano kwasem betulinowym (10 μ M) i betuliną (10 μ M). Liczbę komórek mierzono po 72 godz. za pomocą testu barwienia błękitem trypanu (n=3). *p<0.05, **p<0.01 porównując z grupą kontrolną.

W celu zbadania wpływu traktowania kwasem betulinowym i betuliną na indukcję apoptozy w warunkach normoksji i hipoksji, użyto testu podwójnego barwienia komórek NSCLC aneksyną V i PI (Rysunek 3). Badania wykazały, że traktowanie kwasem betulinowym i betuliną znacząco zwiększa liczbę komórek we wczesnej i późnej fazie apoptozy w liniach komórkowych A549 i H358 w warunkach hipoksji. W linii komórkowej H1703 znacząco indukuje apoptozę tylko traktowanie betuliną. Wyniki sugerują, iż anty-proliferacyjny efekt obserwowany w warunkach hipoksji może być powiązany ze spadkiem liczby komórek związany z apoptozą. Dodatkowo, śmierć komórek nowotworowych, spowodowana jest zmianami w ekspresji białek odpowiedzialnych za mitochondrialny szlak apoptozy oraz poprzez aktywację kaspazy-3 i trawienie białka PARP w warunkach hipoksji.



Rysunek 3. Traktowanie kwasem betulinowym i betuliną zwiększa apoptozę komórek NSCLC w warunkach hipoksji. Komórki A549, H358 i H1703 traktowano kwasem betulinowym (10 μ M) i betuliną (10 μ M). Apoptozę komórek nowotworowych mierzono po 72 godz. za pomocą testu barwienia aneksyną V i jodkiem propidyny (n=3). *p<0.05, **p<0.01 porównując z grupą kontrolną.

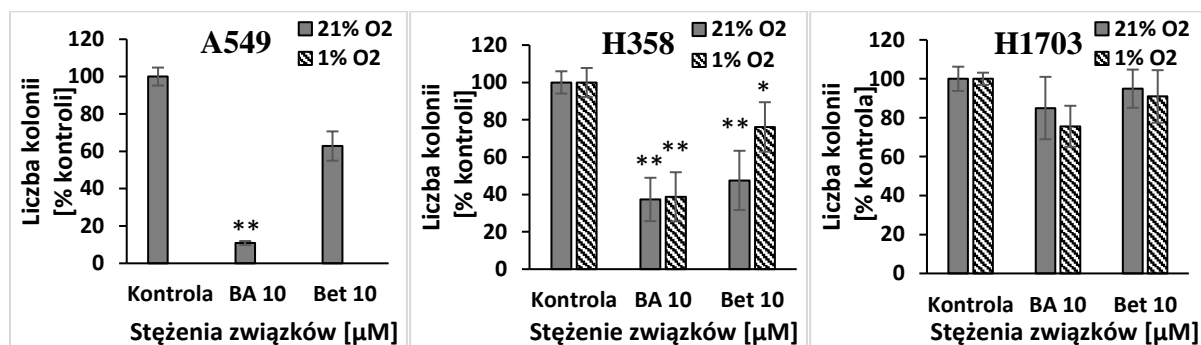
Najważniejszym białkiem, pozwalającym komórkom na adaptację do niskiego stężenia tlenu w środowisku, jest białko HIF-1 α (ang. Hypoxia inducible factor 1 α). Białko to pełni rolę czynnika transkrypcyjnego i odgrywa kluczową rolę w przeprogramowaniu metabolizmu komórek nowotworowych poprzez promowanie ekspresji genów zaangażowanych w niezbędne procesy przetrwania, takie jak angiogeneza czy hamowanie apoptozy [63]. Ponadto, HIF-1 α pełni funkcję stabilizującą i aktywującą białko p53 oraz jest potencjalnie jednym z pierwszych czynników regulujących funkcję białka p53 podczas powstawania nowotworu [68] jednakże, z drugiej strony, białko p53 może deregulować ekspresję HIF-1 α [69, 70]. Dodatkowo, wcześniejsze badania wykazały, iż indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych traktowanych kwasem betulinowym powiązana jest z aktywacją p53 [71, 72]. W tym doświadczeniu (Rysunek 4), po traktowaniu kwasem betulinowym zaobserwowano wzrost ekspresji białka p53 w warunkach normoksji i hipoksji oraz spadek ekspresji HIF-1 α w komórkach A549 bez mutacji genu p53. W komórkach H1703 z mutacją p53 (IVS8+1g>t) zaobserwowano wzrost ekspresji białka p53 po traktowaniu kwasem betulinowym i betulina, jednakże bez spadku ekspresji HIF-1 α . Mechanizm ten może być jedną z przyczyn braku indukcji apoptozy po traktowaniu kwasem betulinowym w tej linii komórkowej. Ponadto, Kamat i współpracownicy wykazali, że obecność zmutowanego białka p53 może zwiększać ekspresję i aktywację HIF-1 α oraz chronić komórki przed apoptozą w warunkach hipoksji [73].



Rysunek 4. Traktowanie kwasem betulinowym i betulina powoduje zmiany w ekspresji białek HIF-1 α oraz p53 w warunkach normoksji i hipoksji. Komórki A549 i H1703 traktowano kwasem betulinowym (10 μ M) i betulina (10 μ M). Zmiany w ekspresji białek mierzono po 24 godz. za pomocą testu Western Blott (n=3).

Dodatkowo, przeprowadzono długoterminowy test aktywności komórek klonogennych. Traktowanie komórek kwasem betulinowym i betulina spowodowało zahamowanie potencjału

klonogenicznego w komórkach A549 i H358, jednakże w warunkach hipoksji tylko kwas betulinowy zmniejszył zdolność tworzenia kolonii komórek NSCLC (Rysunek 5).



Rysunek 5. Traktowanie kwasem betulinowym i betuliną znacząco zmniejsza potencjał klonogeniczny komórek NSCLC w warunkach normoksji i hipoksji. Komórki A549, H358 i H1703 traktowano kwasem betulinowym (10 μM) i betuliną (10 μM). Po 72 godzinach komórki trypsynowano, liczone i zostały wysiane w gęstości 500 komórek/szalkę. Po 14 dniach kolonie barwiono 1% fioletem gencjany i zliczano (n=3). *p<0.05, **p<0.01 porównując z grupą kontrolną.

Badania wykazały, iż kwas betulinowy oraz betulina znacząco obniżają liczbę komórek, indukuje apoptozę i obniżają potencjał klonogeniczny komórek NSCLC w warunkach normoksji i hipoksji, jednakże istnieje wiele różnic w działaniu przeciwnowotworowym tych związków w różnych komórkach oraz warunkach. Mimo to, badania te mogą stanowić nową strategię leczenia w przypadku guzów litych posiadających obniżoną ilość tlenu.

Prezentowane wyniki zostały zamieszczone w publikacji wysłanej do *Scientific Reports*. Aktualnie, artykuł jest na etapie recenzji.

8. Podsumowanie osiągnięcia naukowego

Przedstawiona praca doktorska obejmuje trzy prace opublikowane: jedną pracę przeglądową i dwie prace oryginalne, dotyczące wpływu dziania kombinacji sorafenibu i kwasu betulinowego na komórki nowotworowe niedrobnokomórkowego raka płuca i raka trzustki oraz wyniki niepublikowane dotyczące wpływu kombinacji sorafenibu i kwasu betulinowego na komórki pierwotne nowotworu płuca, a także wpływu kwasu betulinowego i betuliny w warunkach normoksji i hipoksji na linie komórkowe niedrobnokomórkowego raka płuca.

Punktem wyjścia jest praca przeglądowa, w której omówiono typy raka płuca, występujące mutacje oraz klasyczne i celowane leki stosowane w praktyce klinicznej, jak i będące w fazie badań klinicznych (Publikacja 1).

Dwie prace oryginalne zawierają wyniki własne i obejmują kolejno: molekularny mechanizm współdziałania sorafenibu i kwasu betulinowego na proces śmierci komórek niedrobnokomórkowego raka płuca oraz na cząsteczki sygnałowe związane ze szlakami proliferacji i apoptozy (Publikacja 2); wpływ kombinacji sorafenibu i kwasu betulinowego na zahamowanie cyklu komórkowego oraz na kluczowe czynniki związane z hamowaniem proliferacji i potencjału klonogennego w raku trzustki (Publikacja 3). W pierwszej pracy oryginalnej, badania wykazały, że kombinacja sorafenibu i kwasu betulinowego znacznie obniża żywotność i proliferację komórek NSCLC, indukuje apoptozę poprzez aktywację kaspazy 8 i 9 oraz fragmentację PARP. Analiza szlaków sygnałowych metodą western blotting pokazała zmiany w ekspresji białek biorących udział w mitochondrialnym szlaku apoptozy: Bcl-2 i Bax. Dodatkowo zaobserwowano zahamowanie aktywności mTOR i Akt. W drugiej pracy oryginalnej, badania wykazały, iż kombinacja sorafenibu i kwasu betulinowego obniża żywotność i proliferację komórek PDAC oraz hamuje progresję cyklu komórkowego w fazie G2. Również analiza białek powiązanych z cyklem komórkowym wykazała wzrost ekspresji białka p21 oraz spadek ekspresji białka c-Myc i cykliny D1. Ponadto badana kombinacja hamuje aktywność białek związanych ze szlakiem MAPK i PI3K/Akt. W obu badaniach zaobserwowano, iż badana kombinacja synergicznie obniża potencjał klonogeny komórek nowotworowych. Ten długotrwały efekt może być powiązany z wpływem na szlaki proliferacji i cyklu komórkowego.

W części pracy z badaniami nieopublikowanymi przedstawiono wpływ kombinacji sorafenibu i kwasu betulinowego na komórki pierwotne nowotworu płuca otrzymane z

materiału operacyjnego. Wpływ kombinacji został porównany do klasycznie stosowanych obecnych chemioterapeutyków. Wyniki wykazują, iż kombinacja związków obniża żywotność komórek nowotworowych na takim samym poziomie jak cytostatyki w dużym toksycznym dla człowieka stężeniu. Jednakże, ze względu na małą liczbę przebadanych próbek, otrzymane wyniki nie są miarodajne. Szersze badania są potrzebne, aby potwierdzić zaobserwowany efekt przeciwnowotworowy.

Dodatkowo, w pracy przedstawiono nieopublikowane wyniki dotyczące wpływu kwasu betulinowego i betuliny w warunkach normoksji i hipoksji na komórki NSCLC posiadające różny status mutacji p53. Badania wykazały, iż kwas betulinowy w warunkach hipoksji zwiększa apoptozę komórek nieposiadających mutację p53. Efekt ten powiązany jest z spadkiem ekspresji HIF1 α oraz ze wzrostem ekspresji białka p53. Natomiast, w komórkach z mutacją p53 tylko betulina zwiększa liczbę komórek apoptotycznych w warunkach hipoksji. Badania wykazały, iż kwas betulinowy i betulina mimo podobnej struktury mają inny mechanizm działania przeciwnowotworowy w różnych komórkach oraz warunkach.

Podsumowując, wyniki przedstawione w pracy doktorskiej mogą przyczynić się do opracowania skuteczniejszych metod leczenia NSCLC oraz PDAC, ponieważ, sorafenib zwiększa cytotoksyczność kwasu betulinowego. Wykazano także, że kombinacja niskich stężeń związków daje dużo silniejszy efekt przeciwnowotworowy, w porównaniu z pojedynczymi traktowaniami, co może pozwolić na użycie niższych dawek leków, a zatem obniżyć skutki uboczne tych chemioterapeutyków. Dodatkowo, aktualnie brak jest leków działających na nowotwory KRAS-zależne. Badania pokazują, że kombinacja sorafenibu z kwasem betulinowym działa skutecznie niezależnie od rodzaju mutacji KRAS w komórkach.

8. Literatura

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
2. Hawksworth, G., et al., *Tendencje dotyczące raka trzustki w Europie – epidemiologia i czynniki ryzyka*. Medical Studies/Studia Medyczne, 2019. **35**(2): p. 164-171.
3. Rahib, L., et al., *Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States*. Cancer Res, 2014. **74**(11): p. 2913-21.
4. Rawla, P., T. Sunkara, and V. Gaduputi, *Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors*. World J Oncol, 2019. **10**(1): p. 10-27.
5. Bosetti, C., et al., *Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium*. Ann Oncol, 2014. **25**(10): p. 2065-72.
6. Klein, A.P., *Genetic susceptibility to pancreatic cancer*. Mol Carcinog, 2012. **51**(1): p. 14-24.
7. Olson, S.H. and R.C. Kurtz, *Epidemiology of pancreatic cancer and the role of family history*. J Surg Oncol, 2013. **107**(1): p. 1-7.
8. d'Amato, T.A., et al., *Prevalence of in vitro extreme chemotherapy resistance in resected non-small-cell lung cancer*. Ann Thorac Surg, 2006. **81**(2): p. 440-6; discussion 446-7.
9. Hsueh, C.T., *Pancreatic cancer: current standards, research updates and future directions*. J Gastrointest Oncol, 2011. **2**(3): p. 123-5.
10. Czyzykowski, R., J. Polowinczak-Przybylek, and P. Potemski, *Nicotine-induced resistance of non-small cell lung cancer to treatment--possible mechanisms*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2016. **70**: p. 186-93.
11. Yuan, C., et al., *Cigarette Smoking and Pancreatic Cancer Survival*. J Clin Oncol, 2017. **35**(16): p. 1822-1828.
12. Hecht, S.S., *Lung carcinogenesis by tobacco smoke*. Int J Cancer, 2012. **131**(12): p. 2724-32.
13. Wu, X., et al., *Genetic susceptibility to tobacco-related cancer*. Oncogene, 2004. **23**(38): p. 6500-23.

14. Edderkaoui, M. and E. Thrower, *Smoking and Pancreatic Disease*. J Cancer Ther, 2013. **4**(10A): p. 34-40.
15. Yeo, T.P., et al., *Pancreatic cancer*. Curr Probl Cancer, 2002. **26**(4): p. 176-275.
16. McGuigan, A., et al., *Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes*. World J Gastroenterol, 2018. **24**(43): p. 4846-4861.
17. Cheng, L., et al., *Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine*. Mod Pathol, 2012. **25**(3): p. 347-69.
18. Petersen, I., *The morphological and molecular diagnosis of lung cancer*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108**(31-32): p. 525-31.
19. Kutkowska, J., I. Porebska, and A. Rapak, *Non-small cell lung cancer - mutations, targeted and combination therapy*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2017. **71**(0): p. 431-445.
20. *FDA Approval for Erlotinib Hydrochloride - National Cancer Institute*. 2015; Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-erlotinib-hydrochloride>.
21. *FDA Approval for Gefitinib*. 2015; Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-gefitinib>.
22. *FDA Approval for Afatinib Dimaleate*. 2015; Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-afatinibdimaleate>.
23. *FDA Approval for Crizotinib*. 2015; Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-crizotinib>.
24. *FDA Approval for Ceritinib - National Cancer Institute*. 2016; Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-ceritinib>.
25. Dingemans, A.M., et al., *A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIb or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(3): p. 743-51.
26. Heist, R.S., et al., *CALGB 30704 (Alliance): A randomized phase II study to assess the efficacy of pemetrexed or sunitinib or pemetrexed plus sunitinib in the second-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(2): p. 214-21.
27. Sequist, L.V., et al., *Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(24): p. 3307-15.

28. Neoptolemos, J.P., et al., *Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018. **15**(6): p. 333-348.
29. Cazacu, I.M., et al., *Pancreatitis-Associated Genes and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis*. Pancreas, 2018. **47**(9): p. 1078-1086.
30. Ghaneh, P., E. Costello, and J.P. Neoptolemos, *Biology and management of pancreatic cancer*. Postgrad Med J, 2008. **84**(995): p. 478-97.
31. Huttner, F.J., et al., *Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma*. Cochrane Database Syst Rev, 2016. **2**: p. CD006053.
32. Seppanen, H., et al., *The Results of Pancreatic Resections and Long-Term Survival for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Single-Institution Experience*. Scand J Surg, 2017. **106**(1): p. 54-61.
33. Brunner, T.B., *Neoadjuvant therapy for potentially resectable pancreatic cancer: an emerging paradigm?* Curr Oncol Rep, 2013. **15**(2): p. 162-9.
34. Neoptolemos, J.P., et al., *A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(12): p. 1200-10.
35. Oettle, H., et al., *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial*. JAMA, 2007. **297**(3): p. 267-77.
36. Wolfgang, C.L., et al., *Recent progress in pancreatic cancer*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(5): p. 318-48.
37. Kelley, R.K. and A.H. Ko, *Erlotinib in the treatment of advanced pancreatic cancer*. Biologics, 2008. **2**(1): p. 83-95.
38. Moore, M.J., et al., *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. J Clin Oncol, 2007. **25**(15): p. 1960-6.
39. Kindler, H.L., et al., *Axitinib plus gemcitabine versus placebo plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: a double-blind randomised phase 3 study*. Lancet Oncol, 2011. **12**(3): p. 256-62.
40. Philip, P.A., et al., *Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205*. J Clin Oncol, 2010. **28**(22): p. 3605-10.

41. Martin, L.K., et al., *VEGF remains an interesting target in advanced pancreas cancer (APCA): results of a multi-institutional phase II study of bevacizumab, gemcitabine, and infusional 5-fluorouracil in patients with APCA*. *Ann Oncol*, 2012. **23**(11): p. 2812-20.
42. Torphy, R.J., Y. Zhu, and R.D. Schulick, *Immunotherapy for pancreatic cancer: Barriers and breakthroughs*. *Ann Gastroenterol Surg*, 2018. **2**(4): p. 274-281.
43. Zhang, J., K.A. Gold, and E. Kim, *Sorafenib in non-small cell lung cancer*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012. **21**(9): p. 1417-26.
44. Takezawa, K., et al., *Sorafenib inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting B-RAF in KRAS wild-type cells and C-RAF in KRAS mutant cells*. *Cancer Res*, 2009. **69**(16): p. 6515-21.
45. Dasari, A., et al., *A phase I study of sorafenib and vorinostat in patients with advanced solid tumors with expanded cohorts in renal cell carcinoma and non-small cell lung cancer*. *Invest New Drugs*, 2013. **31**(1): p. 115-25.
46. Colombo, M., *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma: a further step toward personalized therapy of liver cancer*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(5): p. 1832-5.
47. Blumenschein, G.R., Jr., et al., *Plasma biomarkers correlating with clinical outcome in a phase II study of sorafenib in advanced NSCLC*. *Cancer Biomark*, 2011. **10**(6): p. 287-98.
48. Lim, S.M., et al., *A multicenter phase II study of sorafenib in combination with erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer (KCSG-0806)*. *Lung Cancer*, 2016. **93**: p. 1-8.
49. Kindler, H.L., et al., *Gemcitabine plus sorafenib in patients with advanced pancreatic cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium*. *Invest New Drugs*, 2012. **30**(1): p. 382-6.
50. El-Khoueiry, A.B., et al., *A randomized phase II of gemcitabine and sorafenib versus sorafenib alone in patients with metastatic pancreatic cancer*. *Invest New Drugs*, 2012. **30**(3): p. 1175-83.
51. Cascinu, S., et al., *Sorafenib does not improve efficacy of chemotherapy in advanced pancreatic cancer: A GISCAD randomized phase II study*. *Dig Liver Dis*, 2014. **46**(2): p. 182-6.
52. Li, X.D., Y.J. Zhang, and J.C. Han, *Betulin inhibits lung carcinoma proliferation through activation of AMPK signaling*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(11): p. 11153-8.
53. Yim, N.H., et al., *Induction of apoptotic cell death by betulin in multidrug-resistant human renal carcinoma cells*. *Oncol Rep*, 2015. **34**(2): p. 1058-64.

54. Majeed, R., et al., *PI3K target based novel cyano derivative of betulinic acid induces its signalling inhibition by down-regulation of pGSK3beta and cyclin D1 and potentially checks cancer cell proliferation*. Mol Carcinog, 2016. **55**(5): p. 964-76.
55. Sun, L., et al., *Betulinic acid inhibits stemness and EMT of pancreatic cancer cells via activation of AMPK signaling*. Int J Oncol, 2019. **54**(1): p. 98-110.
56. Gao, Y., et al., *Combining betulinic acid and mithramycin a effectively suppresses pancreatic cancer by inhibiting proliferation, invasion, and angiogenesis*. Cancer Res, 2011. **71**(15): p. 5182-93.
57. Liao, C.R., et al., *Studies on cytotoxic constituents from the leaves of Elaeagnus oldhamii Maxim. in non-small cell lung cancer A549 cells*. Molecules, 2014. **19**(7): p. 9515-34.
58. Ali-Seyed, M., et al., *Betulinic Acid: Recent Advances in Chemical Modifications, Effective Delivery, and Molecular Mechanisms of a Promising Anticancer Therapy*. Chem Biol Drug Des, 2016. **87**(4): p. 517-36.
59. Majeed, R., et al., *Inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase pathway by a novel naphthol derivative of betulinic acid induces cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells of different origin*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1459.
60. Zuco, V., et al., *Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells*. Cancer Lett, 2002. **175**(1): p. 17-25.
61. Si, L.L., et al., *Establishment and identification of human primary lung cancer cell culture in vitro*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(6): p. 6540-6.
62. Bleijs, M., et al., *Xenograft and organoid model systems in cancer research*. EMBO J, 2019. **38**(15): p. e101654.
63. Salem, A., et al., *Targeting Hypoxia to Improve Non-Small Cell Lung Cancer Outcome*. J Natl Cancer Inst, 2018. **110**(1).
64. Rios, J.L. and S. Manez, *New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid*. Planta Med, 2018. **84**(1): p. 8-19.
65. Fischer, S., et al., *Hypoxia enhances the antiglioma cytotoxicity of B10, a glycosylated derivative of betulinic acid*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94921.
66. Bache, M., et al., *Betulinyl Sulfamates as Anticancer Agents and Radiosensitizers in Human Breast Cancer Cells*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(11): p. 26249-62.
67. Sawada, N., et al., *Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice*. Br J Cancer, 2004. **90**(8): p. 1672-8.

68. Guo, Q., et al., *Hypoxia exposure induced cisplatin resistance partially via activating p53 and hypoxia inducible factor-1alpha in non-small cell lung cancer A549 cells*. *Oncol Lett*, 2018. **16**(1): p. 801-808.
69. Sermeus, A. and C. Michiels, *Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways*. *Cell Death Dis*, 2011. **2**: p. e164.
70. Deben, C., et al., *Hypoxia-Induced Cisplatin Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Is Mediated by HIF-1alpha and Mutant p53 and Can Be Overcome by Induction of Oxidative Stress*. *Cancers (Basel)*, 2018. **10**(4).
71. Shankar, E., et al., *Betulinic Acid-Mediated Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells Involves p53 and Nuclear Factor-Kappa B (NF-kappaB) Pathways*. *Molecules*, 2017. **22**(2).
72. Shen, H., et al., *Betulinic Acid Inhibits Cell Proliferation in Human Oral Squamous Cell Carcinoma via Modulating ROS-Regulated p53 Signaling*. *Oncol Res*, 2017. **25**(7): p. 1141-1152.
73. Kamat, C.D., et al., *Mutant p53 facilitates pro-angiogenic, hyperproliferative phenotype in response to chronic relative hypoxia*. *Cancer Lett*, 2007. **249**(2): p. 209-19.

9. Oświadczenia o udziale procentowym

Dr Irena Porębska

Wrocław, 13.08.2019 r.

Katedra i Klinika Pulmonologii i Nowotworów Płuc

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich

OSWIADCZENIE

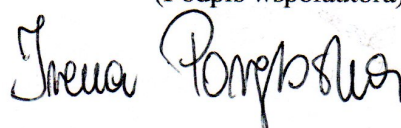
Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Kutkowska Justyna, Porębska Irena, Rapak Andrzej, Non-small cell lung cancer- mutations, targeted and combination therapy; Advances in Hygiene and Experimental Medicine, 2017; 71(0):431-445, IF (2017) 0.783

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Kutkowska Justyna	60 %	Przegląd literatury oraz opracowanie manuskryptu
Porębska Irena	25 %	Przegląd literatury oraz korekta merytoryczna manuskryptu
Andrzej Rapak	15 %	Nadzór nad przygotowaniem oraz sprawdzenie manuskryptu, przegląd literatury, autor korespondencyjny

(Podpis współautora)



Dr hab. Andrzej Rapak

Wrocław, 13.08.2019 r.

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Kutkowska Justyna; Porębska Irena; Rapak Andrzej; Non-small cell lung cancer- mutations, targeted and combination therapy; *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 2017; 71(0):431-445, IF (2017) 0.783

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Kutkowska Justyna	60 %	Przegląd literatury oraz opracowanie manuskryptu
Porębska Irena	25 %	Przegląd literatury oraz korekta merytoryczna manuskryptu
Andrzej Rapak	15 %	Nadzór nad przygotowaniem oraz sprawdzenie manuskryptu, przegląd literatury, autor korespondencyjny

(Podpis współautora)



Doc. dr hab. Andrzej Rapak
Laboratorium Immunobiologii i
Molekularnej Nowotworów
Instytut Immunologii i Terapii
Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

Prof. dr hab. Leon Strzodała

Wrocław, 13.08.2019 r.

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Kutkowska Justyna; Strzodała Leon; Rapak Andrzej; Synergistic activity of sorafenib and betulinic acid against clonogenic activity of non-small cell lung cancer cells; Cancer Science, 2017; DOI: 10.1111/cas.13386, IF (2017) 4.372

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Kutkowska Justyna	70 %	Wykonanie oraz analiza eksperymentów, przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu
Leon Strzodała	15 %	Nadzór merytoryczny nad planowaniem i wykonaniem eksperymentów oraz analizą uzyskanych danych, korekta merytoryczna manuskryptu
Andrzej Rapak	15 %	Nadzór merytoryczny nad planowaniem i wykonaniem eksperymentów oraz analizą uzyskanych danych, sprawdzenie manuskryptu, autor korespondencyjny

(Podpis współautora)

Prof. dr hab. Leon Strzodała

Laboratorium Immunobiologii
Molekularnej Nowotworów

13.08.2019

Dr hab. Andrzej Rapak

Wrocław, 13.08.2019 r.

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Kutkowska Justyna; Strządała Leon; Rapak Andrzej; Synergistic activity of sorafenib and betulinic acid against clonogenic activity of non-small cell lung cancer cells; Cancer Science, 2017; DOI: 10.1111/cas.13386, IF (2017) 4.372

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Kutkowska Justyna	70 %	Wykonanie oraz analiza eksperymentów, przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu
Leon Strządała	15 %	Nadzór merytoryczny nad planowaniem i wykonaniem eksperymentów oraz analizą uzyskanych danych, korekta merytoryczna manuskryptu
Andrzej Rapak	15 %	Nadzór merytoryczny nad planowaniem i wykonaniem eksperymentów oraz analizą uzyskanych danych, sprawdzenie manuskryptu, autor korespondencyjny

(Podpis współautora)



Doc. dr hab. Andrzej Rapak
Laboratorium Immunobiologii i
Molekularnej Nowotworów
Instytut Immunologii i Terapii
Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

Prof. dr hab. Leon Strzodała

Wrocław, 13.08.2019 r.

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Kutkowska Justyna; Strzodała Leon; Rapak Andrzej; Sorafenib in combination with betulinic acid synergistically induces cell cycle arrest and inhibits clonogenic activity in pancreatic ductal adenocarcinoma cells; Int. J. Mol. Sci., 2018; 19, 3234, IF (2018) 4.183

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Kutkowska Justyna	70 %	Wykonanie oraz analiza eksperymentów, przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu
Leon Strzodała	15 %	Nadzór merytoryczny nad planowaniem i wykonaniem eksperymentów oraz analizą uzyskanych danych, korekta merytoryczna manuskryptu
Andrzej Rapak	15 %	Nadzór merytoryczny nad planowaniem i wykonaniem eksperymentów oraz analizą uzyskanych danych, sprawdzenie manuskryptu, autor korespondencyjny

(Podpis współautora)

Prof. dr hab. Leon Strzodała

Laboratorium Immunobiologii
Molekularnej Nowotworów

Dr hab. Andrzej Rapak

Wrocław, 13.08.2019 r.

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Kutkowska Justyna; Strządała Leon; Rapak Andrzej; Sorafenib in combination with betulinic acid synergistically induces cell cycle arrest and inhibits clonogenic activity in pancreatic ductal adenocarcinoma cells; Int. J. Mol. Sci., 2018; 19, 3234, IF (2018) 4.183

jest prawidłowo scharakteryzowany w poniższej tabeli.

Autor	Udział [%]	Opis udziału własnego
Kutkowska Justyna	70 %	Wykonanie oraz analiza eksperymentów, przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu
Leon Strządała	15 %	Nadzór merytoryczny nad planowaniem i wykonaniem eksperymentów oraz analizą uzyskanych danych, korekta merytoryczna manuskryptu
Andrzej Rapak	15 %	Nadzór merytoryczny nad planowaniem i wykonaniem eksperymentów oraz analizą uzyskanych danych, sprawdzenie manuskryptu, autor korespondencyjny

(Podpis współautora)



Doc. dr hab. Andrzej Rapak
Laboratorium Immunobiologii i
Molekularnej Nowotworów
Instytut Immunologii i Terapii
Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

Received: 2016.01.25
Accepted: 2017.02.09
Published: 2017.05.17

Niedrobnokomórkowy rak płuca – mutacje, celowane i skojarzone terapie

Non-small cell lung cancer – mutations, targeted and combination therapy

Justyna Kutkowska¹, Irena Porębska², Andrzej Rapak¹

¹Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda, Wrocław

²Katedra i Klinika Pulmonologii i Nowotworów Płuc, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wrocław

Streszczenie

Z roku na rok zwiększa się liczba zachorowań na niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), spowodowana głównie paleniem tytoniu. Większość pacjentów umiera z powodu zbyt późnego wykrycia nowotworu. Leczenie pacjentów z zaawansowanym NSCLC utrudnia mała wrażliwość tego nowotworu na cytostatyki oraz współistnienie wielu chorób, których podłożem jest, podobnie jak raka płuca, palenie tytoniu. Wraz z rozwojem biologii molekularnej, zaczęto wykorzystywać leczenie celowane oddziałujące na określone szlaki sygnałowe zaangażowane w procesy onkogenezy. Najlepiej przebadane i już wykorzystywane w praktyce klinicznej są związki hamujące funkcję receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych. Niedrobnokomórkowy rak płuca (NSCLC) cechuje się wieloma mutacjami m.in. EGFR – receptora naskórkowego czynnika wzrostu i mutacją KRAS. Rzadszą, ale istotną klinicznie jest rearanżacja genu ALK. W leczeniu chorych z NSCLC wykorzystuje się wiele inhibitorów receptora EGFR, takich jak erlotynib, gefitynib, afatynib oraz dwa związki celowane w kinazę ALK krizotylinib i cerytynib. Niestety, mimo wielu badań, w dalszym ciągu nie można poprawić skuteczności leczenia pacjentów z mutacją KRAS. W literaturze opisano liczne przykłady skojarzonego traktowania komórek NSCLC. Najefektywniejszym rozwiązaniem byłoby połączenie niektórych związków wykazujących synergistyczne działanie na komórki nowotworowe. Niektóre kombinacje związków są już w badaniach klinicznych. Większość prób dotyczy połączenia inhibitorów kinaz tyrozynowych z innego typu inhibitorami farmakologicznymi lub immunoterapią. W pracy opisano mutacje występujące w NSCLC oraz leki stosowane w praktyce klinicznej, jak i będące w fazie badań przedklinicznych.

Słowa kluczowe:

niedrobnokomórkowy rak płuca • mutacje • inhibitory kinaz tyrozynowych • terapia celowana

Summary

Year after year, a growing number of cases of non-small cell lung cancer (NSCLC), mostly caused by smoking, have been noted. Most patients die because of the late detection of cancer and tumor resistance to treatment with cytostatics. Treatment of patients with advanced NSCLC is impeded by the low sensitivity of the tumor to cytostatic agents and the co-existence of many diseases, which substrate is, like lung cancer, cigarette smoking. Along with the development of molecular biology, targeted therapy has started to be used, affecting specific signaling pathways involved in the processes of oncogenesis. Compounds that inhibit the activity of receptor tyrosine kinases are very well examined and already used in clinical practice. NSCLC is characterized by multiple mutations, including EGFR (epidermal growth factor receptor) and KRAS. Rarer but clinically significant is the rearrangement of the ALK gene. Currently, for NSCLC treatment a number of EGFR inhibitors such as erlotinib, gefitinib, afatinib and two

compounds targeted in ALK kinase crizotinib and ceritinib are applied. Unfortunately, despite numerous studies, we are still not able to improve the treatment effectiveness of patients with KRAS mutations. The most efficient solution would be to use a combination of the compounds exhibiting synergistic effects on tumor cells. The literature data describes numerous examples of the combination treatment of NSCLC cells. Some combinations of compounds are already in clinical trials. Most attempts relate to tyrosine kinase inhibitors in combination with other types of pharmacologic inhibitor or immunotherapy. This paper describes the mutations occurring in NSCLC and drugs used in clinical practice as well as being in preclinical development.

Keywords: non-small cell lung cancer • mutations • tyrosine kinase inhibitors • targeted therapy

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1238141>
DOI: 10.5604/01.3001.0010.3826
Word count: 5538
Tables: 3
Figures: 1
References: 120

Adres autora: dr hab. Andrzej Rapak, Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: rapak@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **AC** – gruczolakorak (adenocarcinoma), **AKT** – kinaza białkowa B, serynowo-treoninowa (protein kinase B), **ALCL** – chłoniak anaplastyczny z dużych komórek (anaplastic large-cell lymphoma), **ALK** – kinaza anaplastycznego chłoniaka (anaplastic lymphoma kinase), **BIRC** – niezależny komitet oceniający badania kliniczne (blinded independent central review committee), **BCL-2** – rodzina endogennych białkowych regulatorów apoptozy (B-cell-lymphoma-2), **BCR/ABL** – białko fuzyjne, o aktywności kinazy tyrozynowej (break point cluster region/Abelson murine leukemia viral oncogene homolog), **COX** – cyklooksygenaza (cyclooxygenase), **DCR** – poziom kontroli choroby (disease control rate), **EGFR** – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor), **FDA** – agencja żywności i leków (Food and Drug Administration), **GTP** – kwas guanozynotrójfosforowy (guanosine triphosphate), **HER2** – receptor dla ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (human epidermal growth factor receptor 2), **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor), **IGF1R** – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (insulin-like growth factor 1 receptor), **IRC** – Niezależny Komitet Oceniający (Independent Review Committee), **JAK** – kinaza Janus (Janus tyrosine kinase), **LCC** – rak wielkokomórkowy (large cell carcinoma), **LCINS** – rak płuca u osób, które nigdy nie paliły tytoniu (lung cancer in never smokers), **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana mitogenami (mitogen activated protein kinase), **MEK** – kinaza aktywowana mitogenami (mitogen-activated protein kinase kinase), **NER** – naprawa przez wycięcie nukleotydu (nucleotide excision repair), **NSCLC** – niedrobnokomórkowy rak płuca (non-small cell lung cancer), **ORR** – odsetek obiektywnych odpowiedzi (objective response rate), **OS** – czas przeżycia całkowitego (overall survival), **PDGFR** – receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (platelet-derived growth factor receptor), **PFS** – ocena przeżycia bez progresji (progression-free survival), **PI3K** – kinaza fosfatydylinozytolu (phosphoinositide-3-kinase), **PI3KCA** – gen kodujący podjednostkę katalityczną kinazy PI3K (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha), **PTEN** – białko supresorowe homologu fosfatazy i angiotensyny (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), **RAF** – rodzina kinaz serynowo-treoninowych (Raf serine-threonine kinases), **RAS** – rodzina małych GTP-az (small GTP-ases family), **SCC** – rak płaskonabłonkowy (squamous cell carcinoma), **SCLC** – drobnokomórkowy rak płuca (small cell lung cancer), **STAT** – czynnik transkrypcyjny (signal transducers and activators of transcription), **TKI** – inhibitory kinaz tyrozynowych (tyrosine kinase inhibitors), **TP53** – supresorowy gen nowotworowy białka p53 (tumor suppressor gene tumor protein 53), **VEGFR** – receptor czynnika wzrostu śródbłonna (vascular endothelial growth factor receptor).

WPROWADZENIE

Rak płuca jest główną przyczyną zgonów spośród wszystkich typów nowotworów, zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet [97]. Co roku odnotowuje się ponad 1,5 mln zgonów na całym świecie [114]. Przyczyną tak dużej umieralności jest zbyt późne wykrywanie nowotworu ze względu na bezobjawowy przebieg wczesnych postaci. Skuteczne leczenie NSCLC utrudnia także zaawansowany wiek chorych i związane z tym liczne choroby współistniejące uniemożliwiające najskuteczniejsze leczenie radykalne, polegające na resekcji mięszu płuc lub skojarzeniu chemioterapii i radioterapii. Leczenie zaawansowanych postaci niedrobnokomórkowego raka płuca napotyka na duże trudności związane z często występującą opornością na klasyczne leki cytostaticzne [27]. Powyższe fakty powodują, że 5-letnie przeżycie dotyczy jedynie 15% chorych [14].

Za podstawową przyczynę rozwoju raka płuca uważa się palenie tytoniu [26]. Głównym karcynogenem dymu tytoniowego jest benzopiren, który w wyniku kilku reakcji enzymatycznych, ulega w komórce przemianie w genotoksyczny epoksyd diolu benzopirenu [49]. Metabolit przyłącza się do DNA stając się mutagenem, przyczyniającym się do powstawania błędów genetycznych w czasie replikacji sprzyjających transformacji nowotworowej. Jest to główny mechanizm powstawania nowotworów tytoniozależnych, w tym nie tylko raka płuca, ale i m.in. nowotworów krtani, gardła, żołądka i pęcherza moczowego [115]. Choć zaburzenia w budowie podwójnej helisy wywołane przez epoksyd diolu benzopirenu mogą być usunięte przez system naprawy DNA typu wycinanie nukleotydu (NER – nucleotide excision repair), to jednak w tym przypadku do uruchomienia szlaku naprawczego dochodzi relatywnie rzadko [26]. Co więcej, oddziaływanie pochodnej benzopirenu z DNA na ogół nie blokuje również cyklu komórkowego w fazie G1, jak w przypadku poważnych uszkodzeń chromosomów. W rezultacie dochodzi do replikacji, a synteza nici DNA na matrycy uszkodzonej, związanej z epoksydem diolu benzopirenu, powoduje konwersję nukleotydu G→T [115]. Jeśli do takiej mutacji dojdzie w genach supresorowych nowotworów lub w protoonkogenach, może to doprowadzić do indukcji procesu karcynogenezy [49].

W ostatnich latach obserwuje się również coraz większą liczbę zachorowań na raka płuc u osób, które nigdy nie paliły tytoniu (LCINS) [104]. Zjawisko to częściej można zaobserwować wśród kobiet, zwłaszcza zamieszkujących tereny południowo-wschodniej Azji [106]. Za główne przyczyny uważa się uwarunkowania środowiskowe, takie jak: zanieczyszczenie powietrza, bierne palenie, ekspozycję na radon, azbest, metale ciężkie, wirus brodawczaka ludzkiego, a także uwarunkowania genetyczne [106].

Kliniczny i histopatologiczny podział wyróżnia dwa typy pierwotnych raków płuca: niedrobnokomórkowy rak płuca (NSCLC) (85%) oraz drobnokomórkowy rak płuca

(SCLC) (10-15%) [14]. Powszechniejszy, NSCLC dzieli się na trzy różne postaci histopatologiczne: gruczolakorak (AC), rak płaskonabłonkowy (SCC) oraz rak wielkomórkowy (LCC) (tabela 1) [34].

Tabela 1. Histologiczny podział NSCLC

Podtyp NSCLC	Procent rozpoznai
Gruczolakorak (AC)	40
Rak płaskonabłonkowy (SCC)	25
Rak wielkomórkowy (LCC)	10

na podstawie [34] zmodyfikowano.

Postęp w poznaniu biologii raka płuca spowodował, że coraz częściej do wyboru terapii oraz określenia kierunku badań klinicznych, wykorzystuje się charakterystykę molekularną komórek nowotworowych. Ocena molekularna NSCLC [21] wykazała obecność wielu biomarkerów cząsteczkowych. Markery molekularne, takie jak p63, TTF1, cytokeratyna 5/6 wykorzystuje się już w diagnostyce różnicowej raka płuca i jego podtypów [77]. Poszukuje się również markerów molekularnych użytecznych we wczesnym wykrywaniu raka płuca [73]. Obecnie jednak największe znaczenie mają biomarkery związane z mutacjami dotyczącymi szlaków sygnałowych w komórce. Do najważniejszych, wykorzystywanych w praktyce należą: mutacje receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) [89] i translokacja kinazy chłoniaaka anaplastycznego (ALK) [46]. Wiele innych, np. mutacja KRAS [58] i PI3K [92] podlega intensywnym badaniom (tabela 2). Wyniki tych badań przyczyniły się do wprowadzenia terapii celowanej (lub ukierunkowanej molekularnie) polegającej na zastosowaniu leków skierowanych przeciwko nieprawidłowym białkom lub innym cząsteczkom swoistym dla komórek nowotworowych, których funkcja polega na zaburzeniu ważnych ścieżek sygnałowych i metabolicznych regulujących podstawowe procesy komórki nowotworowej. Tego typu leki są stosowane samodzielnie w raku płuca, jednak ich skuteczność może być znacząca również w połączeniu z klasyczną chemioterapią lub radioterapią, a także i immunoterapią. Obecnie wykorzystuje się głównie inhibitory błonowych kinaz tyrozynowych zapoczątkowujących przekazywanie sygnału do wnętrza komórki. Do leków tego typu należą: erlotynib, gefitynib, które działają przez hamowanie kinazy EGFR i afatynib hamujący receptory rodziny EGFR [37,40,41] oraz kryzotynib i cerytynib oddziałujące na kinazę ALK [38,39]. W fazie klinicznej są prowadzone badania nad sorafenibem, inhibitorem Raf [32], sunitynibem, inhibitorami receptorów VEGFR i PDGFR [50] oraz trametynibem, który hamuje receptor MET [93]. Niezwykle atrakcyjnym celem terapii jest modulacja procesu apoptozy, który pełni główną rolę w transformacji nowotworowej. Wiele uwagi poświęca się też badaniu mediatorów zapalnych oraz procesów immunologicznych, co przyczyniło się do wprowadzenia niwolumabu, jako pierwszego leku immunomodulującego w terapii NSCLC. Wykazano, iż odpowiednio dopasowana terapia celowana, może

wydłużyć przeżycie i czas progresji [67]. Wykonywanie badań molekularnych jest obecnie niezbędne do właściwego zaplanowania terapii i jest już to standardem w NSCLC [63].

W artykule omówiono najważniejsze zmiany molekularne w NSCLC związane z procesem przekazywania sygnałów, apoptozą oraz mediacją procesów zapalnych. Omówiono również wykorzystanie tych danych w praktyce do rozwoju nowych metod leczenia NSCLC. W trzeciej części pracy omówimy kojarzenie różnych sposobów farmakoterapii w celu przełamania narastającej w trakcie leczenia selekcji klonów opornych na leki ukierunkowane molekularnie stosowane w monoterapii.

Tabela 2. Częstość mutacji w cząsteczkach sygnałowych NSCLC

Mutacje w NSCLC [w %]	
Nieznaną	36,4
KRAS	25
EGFR	23
EML4-ALK	6
PI3K	3
B-Raf	3
MET	2

na podstawie [21], zmodyfikowano.

SZLAKI SYGNAŁOWE

EGFR

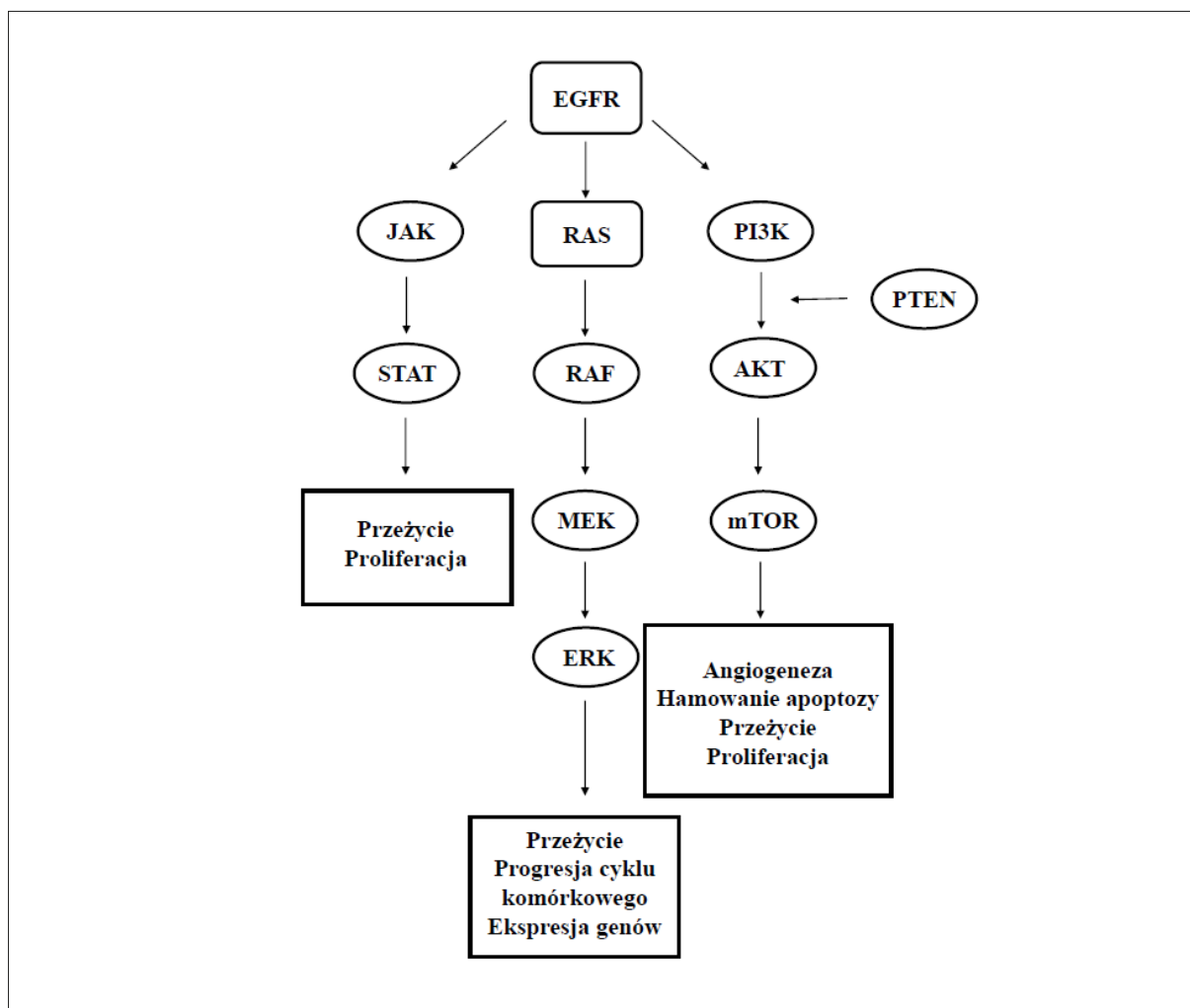
Receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, HER-1, ERBB1) jest członkiem rodziny receptorów kinazy tyrozynowej składającej się z 3 dodatkowych receptorów o podobnej strukturze: EGFR2/HER2/HER-2-NEU/ERBB2, EGFR3/HER-3/ERBB3 i ERBB4/HER4 [1]. Receptory te są zakotwiczone w błonie komórkowej komórek nabłonkowych i zawierają zewnątrzkomórkową domenę wiążącą ligand, domenę transbłonową i wewnątrzkomórkową domenę kinazy tyrozynowej, która pośredniczy w transdukcji sygnału [51]. Po związaniu liganda z receptorem, tworzone są homo- lub heterodimerowe kompleksy receptor-ligand, które powodują internalizację i autofosforylację reszt tyrozynowych, co prowadzi do aktywacji położonych niżej szlaków sygnalizacyjnych [57]. Fosforylowana kinaza tyrozynowa stymuluje wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnału przez kaskadę kilku dalszych szlaków, takich jak Ras-Raf-MEK-MAPK-PI3K-AKT-JAK-STAT, które regulują najważniejsze procesy życiowe komórek, w tym szczególnie ważne dla rozwoju nowotworów proliferacji, apoptozy i tworzenia naczyń krwionośnych (ryc. 1) [57,89]. Badania wykazały, że nieprawidłowa ekspresja lub mutacje w obrębie EGFR odgrywają znaczącą rolę w rozwoju, progresji i nabywaniu chemooporności NSCLC. Prawdopodobnie zmutowany gen *EGFR* jest głównym czynnikiem utrzy-

mującym samowystarczalność w zakresie sygnału proliferacyjnego i podtrzymującym fenotyp nowotworowy w niektórych NSCLC [44]. Raki płuc ze zmutowanym receptorem EGFR wykazują dużą zależność od sygnałów proliferacyjnych inicjowanych przez aktywność tego receptora, a jednocześnie dużą podatność na apoptozę w przypadku zahamowania funkcji tego receptora [101]. Nadekspresję EGFR zaobserwowano u 15% pacjentów z NSCLC. Może się pojawiać w wyniku działania różnych mechanizmów, takich jak zwiększenie liczby kopii genu, modyfikacje epigenetyczne i aktywacja przez onkogenne wirusy [29]. Najczęstsze mutacje EGFR u chorych na NSCLC polegają na delecji w eksonie 19 i swoistej mutacji punktowej w eksonie 21 kodonu 858. Obie nieprawidłowości stanowią około 80-90% wszystkich wykrytych mutacji EGFR. Mutacje te stanowią czynnik predykcyjny w zastosowaniu inhibitorów kinaz tyrozynowych i wykryto je głównie w gruczolakorakach u niepalących kobiet [105]. Niewykluczone, że jest to kluczowe zdarzenie molekularne w rozwoju NSCLC u osób niepalących. Warto zwrócić uwagę, że mutacje w genie *EGFR* mogą być również przyczyną niewrażliwości na inhibitory kinaz pierwszej generacji, takich jak erlotynib i gefitynib. Do tego typu należy mutacja punktowa w pozycji T790M polegająca na substytucji metioniny w treoninę. Ta zmiana genetyczna może mieć charakter pierwotny lub pojawić się jako wtórna podczas leczenia, co więcej może mieć również potencjał onkogeny [8,60].

Rola pozostałych receptorów z rodziny EGFR w raku płuca jest słabiej poznana. Najwięcej danych dotyczy HER-2 NEU. Obecnie wydaje się, że wysoka ekspresja HER2-NEU i innych, poza EGFR, receptorów tej rodziny sprzyja nabywaniu oporności na wybiórcze inhibitory kinaz ze względu na możliwość heterodimeryzacji receptora EGFR i potencjalizacji jego funkcji poprzez np. zastąpienie jego unieczynnionej podjednostki kinazowej, podjednostką partnera. HER2-NEU ulega heterodimeryzacji z EGFR [64], a przy tym wykazuje stałą aktywność domeny zewnątrzkomórkowej [53]. Ekspresja tego receptora występuje w około 30% NSCLC. Wykryto również mutacje genu kodującego HER2-NEU w około 1,6% NSCLC [96]. Znacznie mniej wiadomo na temat znaczenia receptora HER3-NEU oraz mutacji w genie kodującym to białko w odniesieniu do NSCLC. Receptor ten jest nieco odmienny ze względu na fakt, że po związaniu z ligandem głównie potencjalizuje efekt działania innych receptorów z rodziny EGFR poprzez dimeryzację, a sama słabo aktywną lub nieaktywną kinazę tyrozynową [2]. Niedawno Umelo i wsp. wykazali, że zmutowany HER3 (HER3-V855A) może pełnić onkogeną funkcję w raku płuca i stanowić atrakcyjny cel terapii [109].

EML4-ALK

Kinaza anaplastycznego chłoniaka (ALK) jest transbłonową receptorową kinazą tyrozynową należącą do nadrodziny receptorów insulinowych [46]. Aktywacja genu *ALK* odbywa się zwykle poprzez przegrupowanie chromosomów w wyniku umieszczenia jednego z kilku



Ryc. 1. Szlak receptora EGFR (na podstawie [74] zmodyfikowano)

różnych partnerów fuzyjnych, a także przez związanie z nimi regionu promotora przed domeną kinazy ALK, powodując jego transkrypcję i ekspresję białka [10]. Kilka lat temu w komórkach NSCLC wykryto nową rearanżację genu w wyniku fuzji między genem *EML4* i genem *ALK*. Białko *EML4-ALK* zawiera N-końcową domenę *EML4* oraz wewnątrzkomórkową domenę katalityczną *ALK*. Region *EML4* powoduje konstytutywną dimeryzację domeny kinazy *ALK*, prowadząc do nieprawidłowej aktywacji przekazywania sygnałów, za pośrednictwem takich mediatorów jak Akt, STAT3 i ERK1/2 [10]. Powoduje to proliferację i przetrwanie komórki nowotworowej; znanych jest wiele wariantów kodujących białko *EML4-ALK*. U prawie 33% pacjentów z mutacją *EML4-ALK* w NSCLC wykryto kodowanie prowadzące do zestawienia eksonu 13 *EML4* do eksonu 20 *ALK* (E13, A20). U 29% pacjentów zaobserwowano dołączenie eksonu 6 *EML4* do eksonu 20 *ALK* (E6a/b, A20). Ponadto, zidentyfikowano kilka innych, rzadszych partnerów fuzyjnych *EML4*, takich jak *TFG-ALK* oraz *KIF5B* [46]. Transformację rearanżującą gen *ALK* zaobserwowano nie tylko w NSCLC, ale również w innych w guzach litych, takich jak chłoniak

anaplastyczny z dużych komórek (ALCL), guzach miofibroblastycznych, co sugeruje, iż przekazywanie sygnału za pośrednictwem *ALK* może odgrywać rolę w rozwoju i progresji wielu nowotworów [54].

KRAS

Mutacja protoonkogennego szlaku RAS jest stwierdzana prawie u jednej trzeciej ludzkich typów nowotworów [6,33]. U ludzi występują trzy geny kodujące cztery różne białka Ras: H-RAS, N-RAS, K-RAS-4A i K-RAS-4B, dwa ostatnie to alternatywne warianty składania genu *KRAS* [81]. Zewnątrzkomórkowe sygnały aktywują białka Ras, które wiążą się z molekułą zwaną GTP biorącą udział w wielu procesach komórkowych, obejmujących proliferację, różnicowanie i apoptozę. Onkogenne postaci RAS preferencyjnie wiążą GTP, przez co pozostają ciągle w postaci aktywnej [81]. Białko Ras może być aktywowane przez wiele mechanizmów, np. przez receptory o aktywności kinaz tyrozynowych, takich jak EGFR i inne receptory czynników wzrostu, jak PDGFR i IGF1R lub przez mutację aktywującą w genie kodującym [6].

Szlak efektorowy Ras składa się z kinaz RAF – MEK – ERK (ryc. 1) [58]. Raf aktywowany jest za pomocą części białka Ras pośredniczącej w przyłączaniu do błony komórkowej, następnie, Raf aktywuje kinazy MEK1/2, które aktywują ERK1/2. Aktywowane kinazy ERK1/2 fosforylują kilka cytoplazmatycznych i jądrowych białek obejmujących czynniki transkrypcyjne, które kontrolują przejścia G1-S cyklu komórkowego [6]. Szlak Ras jest więc uniwersalnym łańcuchem przekazywania sygnału pełniącym główną rolę w komunikacji wewnątrz komórki i sterującym przekazywaniem różnorodnych sygnałów, w tym przede wszystkim proliferacyjnych [47]. Ciągła aktywność szlaku Ras wynikająca z mutacji ma bardzo duże znaczenie nie tylko w powstaniu oraz podtrzymaniu fenotypu nowotworowego, ale i w oporności na terapię przeciwnowotworową. U ponad 25% pacjentów z NSCLC obserwuje się mutację *KRAS*, z czego w 97% przypadkach mutacja występuje w eksonie 2 i 3 (G12, G13 i Q61). Ze względu na bardzo duże znaczenie i bardzo częste występowanie tej onkogennej mutacji, wiele badań skupia się nad opracowaniem czynników hamujących dalsze elementy szlaku, takie jak kinazy MEK i Raf [33]. Niestety, jak dotychczas, białka Ras pozostały nieosiągniętym celem i nie opracowano jeszcze celowanej terapii skierowanej bezpośrednio w nowotwory Ras-aktywne [68].

B-Raf

B-Raf jest jednym z trzech członków rodziny kinazy Raf: A-Raf, B-Raf, C-Raf. Należy do grupy kinaz serynowo-treoninowych i odgrywa istotną rolę w aktywacji ścieżki mitogennej kinazy białkowej MAPK [11,18]. Kinaza B-Raf leży poniżej Ras w szlaku sygnałowym RAS-RAF-MEK-ERK, odpowiedzialnym za wzrost komórek. Najczęściej mutację *BRAF* obserwuje się w czerniaku (mutacja V600E) [15]. Mutacje *BRAF* wykrywane są dość rzadko, bo u około 2% pacjentów z NSCLC. W NSCLC prawie 80% przypadków to mutacja w V600E następująca przez substytucję aminokwasów w eksonie 15. Obserwowane są także mutacje non-V600E rozproszone w eksonie 11 i 15 [11]. Wiele mutacji non-V600E wykazuje tylko pośrednią lub małą aktywność kinazy, a dane z badań przedklinicznych wskazują, że raki charakteryzujące się obecnością kinazy B-raf non-V600E są odporne na leczenie celowane, chociaż niektóre z nich mogą być wrażliwe na inhibitory szlaku MEK [15]. Mimo że mutacje białka B-Raf w NSCLC zaobserwowano i opisano wiele lat temu, to nadal nie są dobrze poznane ze względu na małą liczbę przypadków [18].

PI3K

Kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3K) odgrywa kluczową rolę w metabolizmie komórkowym i proliferacji, wpływając na powstawanie różnych ludzkich nowotworów [25]. Po aktywacji, PI3K inicjuje zdarzenia prowadzące do fosforylacji Akt, mającej wpływ na dodatkowe białka szlaku przekazywania sygnałów [25]. Na nadaktywność PI3K wpływa mutacja *PIK3CA*, genu kodującego katalityczną podjednostkę p10a PI3K, a także brak aktywności

białka supresorowego homologu fosfatazy i angiotensyny PTEN. Białko PTEN odgrywa ważną rolę w regulowaniu szlaku PI3K, a brak jego ekspresji może działać przeciwapoptotycznie i spowodować przetrwanie nowotworu [69]. W NSCLC znaczące mutacje w obrębie *PIK3CA* wpływają na spiralną domenę wiążącą (ekson 9, E545K lub E542K) lub na katalityczną podjednostkę (ekson 20, H1047R lub H1047L) i są uznawane za potencjalny onkogeny cel terapii [92].

MET

Receptor MET został scharakteryzowany, jako receptor transbłonowy, który jest aktywowany przez czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) [31]. Wiązanie HGF z MET powoduje dimeryzację receptora i autofosforylację reszt tyrozynowych w domenie kinazy, co prowadzi do aktywacji położonych niżej kaskad sygnalizacyjnych, w których pośredniczą głównie ścieżki RAS-MAPK i PI3K-AKT. Ponadto, w kilku badaniach wykazano występowanie współpracy oraz komunikacji między receptorem MET i innymi szlakami receptorowymi, w tym EGFR, HER2-NEU i IGF1R [13]. Dowiedziono, że amplifikacja MET w liniach komórkowych raka płuc może wywołać oporność na inhibitory EGFR przez aktywację HER3 zależnej od szlaku PI3K-AKT [13,31].

COX-2

Cyklooksygenaza (COX) jest głównym enzymem konwersji kwasu arachidonowego do prostaglandyn. Istnieją trzy izoenzymy COX: COX-1 i COX-2 oraz COX-3 (split variant COX1). COX-1 występuje w wielu prawidłowych tkankach, podczas gdy COX-2 syntetyzowany jest pod wpływem mediatorów zapalnych i mitogennych i odgrywa ważną rolę w reakcjach zapalnych [19]. Wykazano, że nadekspresja COX-2 wspiera i podtrzymuje wzrost nowotworów przez zwiększenie odporności na sygnał apoptotyczny, indukowanie angiogenezy oraz zmniejszenie odpowiedzi immunologicznej organizmu przeciwko nowotworowi. COX-2 ulega nadekspresji w różnych typach nowotworów, takich jak rak żołądka, przełyku oraz płuca. Zwiększona ekspresja COX-2 jest także związana z bardziej agresywnym zachowaniem nowotworu i gorszą prognozą u pacjentów z NSCLC [12]. Być może COX-2 jest jednym z mediatorów związanych ze znanym zjawiskiem indukcji powstawania nowotworów w przewlekłych stanach zapalnych [116].

p53

Supresorowy gen nowotworowy kodujący białko p53 (*TP53*) odgrywa ważną rolę w procesie apoptozy, zatrzymaniu cyklu komórkowego i utrzymaniu stabilności genomu. Mutacje *TP53* powodują inaktywację białka p53, które realizuje swoją funkcję przez aktywację transkrypcji setek genów wskutek wiązania się do swoistych sekwencji w ich miejscach promotorowych [65]. Mutacje genu *TP53* są jednymi z najczęstszych i najbardziej uniwersalnych zmian genetycznych wykrywanych w nowo-

tworach, w tym również w NSCLC (65% przypadków) [5]. Często występują w zmianach przednowotworowych oraz w histologicznie prawidłowej śluzówce oskrzela, otaczającej nowotwór, co świadczy o ich znaczeniu już we wczesnych etapach transformacji nowotworowej. Ponadto, mutacje *TP53* mogą się wiązać ze złym rokowaniem, a także ze słabą odpowiedzią na chemioterapię i radioterapię [5].

Bcl-2

Po raz pierwszy białka Bcl-2 zidentyfikowano w chłoniaku. Rodzina Bcl-2 obejmuje około 20 homologów w tym białka antyapoptotyczne, takie jak Bcl-2, Mcl-1 i Bcl-xL oraz proapoptotyczne Bax, Bak i Bid [80]. Członkowie rodziny Bcl-2 sterują integralnością zewnętrznej błony mitochondrialnej, a zatem są istotne w określaniu wrażliwości komórek na apoptozę indukowaną przez szlak wewnętrzny. Równowaga między przeżyciem i śmiercią komórek jest modulowana przez proporcje i interakcje antyapoptotycznych i proapoptotycznych białek tej rodziny [120]. Białka Bcl-2 wykryto zarówno w komórkach podstawnych nabłonka nienowotworowej błony śluzowej oskrzeli jak i raku płuca [80]. Według niektórych badań wysoka ekspresja Bcl-2 jest związana z niekorzystnymi efektami leczenia w różnych typach nowotworów, w tym nowotworów gruczołu krokowego, przełyku, nerek, jak również u pacjentów z NSCLC [55]. Inne badania wskazują na dłuższe przeżycie chorych, których guzy wykazują dużą ekspresję białek Bcl-2 [3]. Mimo dużej liczby badań, rola Bcl-2 w przewidywaniu wyników leczenia pozostaje więc kontrowersyjna.

LECZENIE NSCLC A CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA

Szanse na 5-letnie przeżycie pacjentów z NSCLC są zróżnicowane i zależą głównie od stadium klinicznego choroby. Najwyższe, 73% szanse na 5-letnie przeżycie mają pacjenci, u których nowotwór został wcześniej wykryty (stadium IA). W stadium IB i II wynoszą nawet do 52,2%, a w zaawansowanym NSCLC (stadia IIIA-IV) zaledwie do 3,7% [30]. U około 20-30% pacjentów z NSCLC w stadium I, II i IIIA stosuje się leczenie radykalne oparte przede wszystkim na chirurgicznej resekcji uzupełnionej niekiedy chemioterapią, pozostali pacjenci mogą otrzymać połączone: chemioterapię i radioterapię lub wyłącznie radioterapię [107]. Chemioterapia oparta na cisplatynie, jako uzupełnienie leczenia chirurgicznego, może zwiększyć szansę przeżycia, we wczesnym stadium nowotworu nawet o 5%. Niestety, u wielu chorych z niskim zaawansowaniem raka płuca dochodzi do nawrotu choroby, czemu sprzyja przede wszystkim obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych (cecha N1). U 21% pacjentów w stadium IA i aż u 42% w stadium IB obserwuje się wznowę choroby nowotworowej, która kończy się śmiercią [16]. Pacjenci w stadium IIIB mogą być leczeni radykalnie kombinacją chemioterapii i radioterapii lub być poddani tylko leczeniu paliatywnemu. Chorzy w stadium IV otrzymują wyłącznie leczenie paliatywne. Wielu (40-50%) pacjentów z NSCLC będących

w stadium regionalnie zaawansowanym lub z przerzutami (IIIB i IV), nie jest kwalifikowanych do skojarzonej terapii radykalnej (chemio-radioterapii). Tacy pacjenci byli dotychczas leczeni tylko paliatywną chemioterapią systemową opartą na pochodnych platyny, bez szans na wyleczenie, a tylko w celu przedłużenia i poprawy jakości przeżycia [4]. Wśród tych pacjentów leczenie systemowe pozwala na wydłużenie czasu życia nawet o 8-12 miesięcy, a także poprawia jakość życia [4]. Wybór terapii dla pacjentów w zaawansowanym stadium, zależał do niedawna tylko od histologicznego typu choroby, stanu ogólnego, chorób współistniejących i wcześniejszego leczenia [45]. Obecnie do tych danych niezbędne jest dołączenie charakterystyki molekularnej NSCLC u indywidualnych chorych. W przypadku choroby przerzutowej leczenie cytostatykami oparte jest na połączeniu cisplatyny lub karboplatyny z lekami takimi jak paklitaksel, docetaksel, gemcytabina i winorelbina, które z pochodnymi platyny wykazują większą skuteczność w porównaniu z terapią opartą na pojedynczym cytostatyku [45]. Wydaje się jednak, że klasyczna chemioterapia, jako samodzielna metoda leczenia, wyczerpała swój potencjał i nie oczekuje się już znaczących postępów w jej rozwoju.

CELOWANA MONOTERAPIA NSCLC

Mała skuteczność leczenia zaawansowanego raka płuca skłoniła do poszukiwania bardziej zaawansowanych metod opartych na nowej koncepcji: uderzającego w „czułe punkty” nowotworu. Wraz z postępem w biologii molekularnej taka koncepcja zyskała szansę na realizację. Szczególną uwagę poświęca się genetyce NSCLC. Odkrywa się coraz nowsze mutacje w komórkach nowotworowych i określa się ich znaczenie w rokowaniu i ocenie wrażliwości na nowe generacje leków przeciwnowotworowych (omówione w pierwszej części pracy).

Najważniejszą grupę leków ukierunkowanych molekularnie, o znanych czynnikach predykcyjnych tworzą inhibitory kinazy tyrozynowych (tabela 3).

Pacjenci z mutacją aktywującą w genie *EGFR* mogą być leczeni bardzo skutecznie lekami hamującymi aktywność zmutowanego receptora: odwracalnymi i wysoce wybiórczymi, jak erlotynib i gefitynib lub nieodwracalnymi oraz mniej wybiórczymi jak afatynib. Niestety, ich zastosowanie ogranicza mała częstość mutacji predykcyjnej wynosząca dla rasy kaukaskiej tylko około 13% [110]. Związki te wiążą się z wewnątrzkomórkową domeną EGFR i hamują działanie receptora blokując szlak przekazywania sygnału do jądra komórki. Zahamowanie czynności EGFR w komórkach nowotworowych blokuje wewnątrzkomórkowe onkogenne szlaki przekazywania informacji omówionych w pierwszej części pracy [61]. Przeprowadzono wiele badań *in vitro* i *in vivo* oceniających wpływ erlotynibu, gefitynibu i afatynibu na komórki nowotworowe. Podczas badań przedklinicznych wykazano, że inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR zahamowały wzrost hodowli linii komórkowych wywodzących się z różnych nowotwo-

Tabela 3. Inhibitory kinaz tyrozynowych w niedrobnokomórkowym raku płuca

Lek	Cel molekularny	Wskazanie do leczenia	Faza badań	
Erlotinib (Tarceva)	EGFR	Leczenie pacjentów z mutacją EGFR z delecją w eksonie 19 lub 21(L858R)	Zgoda FDA	[40]
Gefitynib (Iressa)	EGFR	Leczenie pacjentów z mutacją EGFR z delecją w eksonie 19 lub 21(L858R)	Zgoda FDA	[41]
Afatynib (Gilotrif)	EGFR	Leczenie pierwszego rzutu u pacjentów z mutacją EGFR z delecją w eksonie 19 lub 21(L858R)	Zgoda FDA	[37]
Krizotynib (Xalkori)	ALK	Pacjenci z ALK-pozytywnym oporni na pochodne platyny	Zgoda FDA	[39]
Cerytynib (Zykadia)	ALK	Pacjenci z ALK-pozytywnym, z nawrotem choroby lub z nietolerancją na krizotynib	Zgoda FDA	[38]

rów litych [23]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach na modelach zwierzęcych, w których podanie leku powodowało zmniejszenie lub zahamowanie wzrostu przeszczepów ludzkich guzów u myszy [100]. Inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR powodowały również zatrzymanie cyklu komórkowego, zwiększały apoptozę oraz zmniejszały zdolność komórek do migracji [23].

Na podstawie pozytywnych wyników badań przedklinicznych, rozpoczęto badania kliniczne z udziałem inhibitorów EGFR. Równocześnie wprowadzono do praktyki klinicznej w leczeniu NSCLC dwa drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz: erlotynib i gefitynib. Początkowo zastosowanie niektórych inhibitorów kinaz tyrozynowych (np. erlotynibu) było oparte głównie na badaniach przedklinicznych i przewidywaniu skutku wynikającego z zablokowania EGFR [95]. Rezultaty takiego podejścia były zadowalające i wyselekcjonowano grupę chorych, u których skuteczność tego leku była szczególnie duża. Były to osoby niepalące, pacjenci z podtypem gruczolakoraka wykazującego ekspresję białka EGFR [95]. W analizie retrospektywnej tego badania okazało się, że czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na erlotynib może być zwielokrotnienie kopii genu oceniane metodą hybrydyzacji *in situ* [108]. W następnych latach udowodniono jednak, że najsilniejszym czynnikiem predykcyjnym w odpowiedzi na erlotynib jest występowanie swoistych mutacji w genie *EGFR*. Obecność tych mutacji wyraźnie zwiększała skuteczność leczenia raków „EGFR zależnych” i pozwoliła na znaczące wydłużenia przeżycia chorych na zaawansowanego raka płuca przy zminimalizowaniu objawów niepożądanych [78,90], co potwierdzono w badaniach fazy IV [82].

Podobnie jak erlotynib również gefitynib, drugi odwracalny inhibitor kinazy tyrozynowej, znalazł szerokie zastosowanie kliniczne u pacjentów z mutacją aktywującą w genie *EGFR*. Jego skuteczność w leczeniu zaawansowanego NSCLC zarówno w pierwszej, jak i kolejnych (po klasycznej chemioterapii) liniach leczenia potwierdzono w licznych badaniach klinicznych [48,71,72].

Dużym problemem w praktyce klinicznej jest wystąpienie oporności na inhibitory kinaz tyrozynowych. Wiele

badania wskazało markery molekularne tej oporności, która może być zarówno nabyta (np. mutacja T790M, amplifikacja MET czy HER2-NEU) lub pierwotna (np. mutacja KRAS, BRAF, PIK3CA czy translokacja EML4-ALK) [98]. Odpowiedzią na ten problem była synteza inhibitorów kinaz kolejnej generacji. Trzecim, wprowadzonym do praktyki klinicznej inhibitorem kinaz tyrozynowych, jest afatynib. Różni się od poprzednich inhibitorów przede wszystkim tym, że wiąże się nieodwracalnie nie tylko z EGFR, ale i innymi członkami tej rodziny i to zarówno gdy tworzą one homo-, jak i heterodimery. Afatynib przejawia aktywność wobec komórek raka z obecnością mutacji T790M, powodującą oporność na erlotynib i gefitynib. Afatynib wykazał większą skuteczność zarówno w porównaniu do klasycznej chemioterapii [94] i był skuteczny u chorych, u których wystąpiła progresja po leczeniu erlotynibem lub gefitynibem [52]. Najnowszym lekiem z grupy inhibitorów kinaz tyrozynowych zaaprobowanym w przyspieszonej procedurze rejestracyjnej w USA oraz warunkowo dopuszczonym do obrotu w krajach Unii Europejskiej jest ozymertynib (AZD9291) [36]. Ozymertynib jest inhibitorem 3 generacji wykazujący dużą skuteczność u pacjentów z mutacją T790M genu *EGFR* i wspomniana wyżej rejestracja dotyczy zastosowania leku u chorych z NSCLC z taką mutacją genetyczną.

W fazie badań klinicznych są również wybiórcze inhibitory HER2-NEU i HER3-NEU w raku płuca. Obiecujące wyniki uzyskano dla patritumabu, który jest przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko HER3-NEU [66]. W subanalizie badania HERALD sugeruje się, że markerem predykcyjnym skuteczności patritumabu może być poziom mRNA dla heregulininy – liganda HER3-NEU [70].

Do nowych leków z grupy inhibitorów kinaz tyrozynowych należą leki hamujące kinazę ALK. Pacjenci, u których wykryto fuzję genów *EML4* i *ALK*, a w następstwie onkogeną aktywację ALK mogą być leczeni drobnocząsteczkowymi inhibitorami – krizotynibem oraz cerytynibem [38,39]. W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że krizotynib hamuje fosforylację ALK i transdukcję sygnału, co w rezultacie zatrzymuje cykl komórkowy

w fazie G1-S i indukuje apoptozę [22]. Zgoda na wykrzystanie kryzotyningu w leczeniu pacjentów została oparta na badaniach klinicznych, w których wykazano lepszą skuteczność leku w zakresie przeżycia wolnego od progresji (PFS) i całkowitej odpowiedzi na leczenie (ORR) w porównaniu z chemioterapią. Początkowo lek zarejestrowano do leczenia chorych z rearanżacją genu *ALK*, jednak w marcu 2016 r. FDA wydała decyzję o dopuszczeniu tego leku również u chorych z NSCLC wykazującym rearanżację genu *ROS1* [86]. Podobnie jak w inhibitorach EGFR, również w przypadku białka Alk obserwuje się nabywanie oporności lub pierwotną oporność na kryzotyning [42]. Odpowiedzią na ten problem kliniczny było opracowanie inhibitorów *ALK* drugiej generacji. Do tej grupy należy certynyng. Działanie certynyngu blokuje autofosforylację zmutowanego receptora *ALK* i tym samym blokuje przekazywanie sygnału do wnętrza komórki. Związek jest zarejestrowany do leczenia pacjentów, którzy są oporni na kryzotyning [38]. Jego skuteczność potwierdzono w dwóch wielośrodkowych badaniach z jedną grupą leczonych i oczekuje się wyników badań randomizowanych. Drugim lekiem aktywnym po niepowodzeniu leczenia kryzotyningiem, jest alektynyng [84]. Na podstawie przyspieszonej procedury rejestracyjnej w grudniu 2015 r. FDA ustaliła wskazanie do zastosowania tego leku w zaawansowanym NSCLC z mutacją *EMLA4-ALK* u chorych z progresją po leczeniu kryzotyningiem lub nietolerancją tego leku [84]. Tak więc przykład inhibitorów błonowych kinaz tyrozynowych obrazuje znaczący postęp w leczeniu celowanym NSCLC wyrażający się nie tylko w syntezie i udowodnieniu skuteczności leczenia ukierunkowanego molekularnie u chorych z określonym zdarzeniem genetycznym, ale też odpowiedzi na narastającą w trakcie leczenia oporność na leki.

Jednym z najczęstszych typów mutacji w NSCLC jest mutacja genu *KRAS*, na którą nie opracowano jeszcze skutecznej celowanej terapii. Nie powiodły się bezpośrednio próby zahamowania zmutowanego białka *KRAS* [68]. W najnowszych badaniach naukowcy skupili się więc na próbach wielopoziomowego zahamowania szlaków przekazywania informacji w taki sposób, aby skutecznie zablokować kaskadę sygnałową, mimo stałej aktywności zmutowanego białka *KRAS* [43]. Taka idea doprowadziła do syntezy i badań klinicznych nad multipotentjalnymi inhibitorami kinaz, do których należy np. sorafenib [58]. Sorafenib jest wielokinazowym inhibitorem wpływającym na aktywność kinaz tyrozynowych receptorów błonowych oraz wewnątrzkomórkowych kinaz serynowo-treoninowych elementów szlaku sygnałowego Ras/MAPK [112]. Jako jeden z nielicznych nowych leków celowanych blokuje jednocześnie kinazy błonowe i wewnątrzkomórkowe. Działanie tego typu leków, pozwalające na „zignorowanie” stale aktywnego białka Ras może być skuteczne zarówno w pierwotnej terapii jak i u chorych z nabytą opornością na inhibitory kinaz błonowych. Efekt funkcjonalny sorafenibu w badaniach *in vitro* i *in vivo* wiąże się z działaniem przeciwproliferacyjnym,

jak i przeciwingiennym [119]. Lek został już zarejestrowany w rakach wątrobowokomórkowym, nerkokomórkowym i zróżnicowanym raku tarczycy [28]. W NSCLC trwają obecnie intensywne badania. Użytkano już obiecujące wyniki badania II fazy pacjentów z zaawansowanym NSCLC (stadium III B lub IV) cechującym się mutacją genu *KRAS*. Koncepcja zablokowania szlaku sygnałowego poniżej białka Ras znalazła wyraz w syntezie związków hamujących kinazę MEK. Należy do nich np. selumetinib, który obecnie znajduje się w fazie badań klinicznych zarówno w monoterapii, jak i z innymi lekami [7]. Natomiast niepowodzeniem jak dotąd zakończyły się badania nad innym inhibitorem MEK trametyningiem, który w monoterapii nie okazał się skuteczniejszy niż docetaksel, natomiast wykazał się znaczącymi objawami niepożądanymi, w tym zgnoami [9].

Badania nad przywróceniem właściwej regulacji apoptozy na skutek restytucji prawidłowej funkcji białka p53 są zaawansowane, ale nie przyniosły jeszcze wymiernych efektów w postaci wprowadzenia celowanej terapii w NSCLC. Terapie zmierzającą do restytucji prawidłowego białka p53 zastosowali po raz pierwszy Roth i wsp. w 1996 r. [91], jednak ta postać terapii genowej nie znalazła zastosowania w praktyce NSCLC. W leczeniu raka płaskonabłonkowego głowy i szyi zarejestrowano natomiast w Chinach produkt biotechnologiczny Gencidine [76]. Jednak produkty do terapii genowej budzą dość liczne kontrowersje związane zarówno z odległymi skutkami terapii, jak i np. warunkami produkcji i podawania genetycznie zmodyfikowanych cząsteczek, jako przykład można podać Adnexynę, która ostatecznie nie została dopuszczona do obrotu w Unii Europejskiej do leczenia zespołu Li-Fraumeni [35].

SKOJARZONA TERAPIA NSCLC

Klasyczne cytostatyki stosowane obecnie w terapii przeciwnowotworowej mają podobny mechanizm działania i małą swoistość. Stosowane jednocześnie wykazują działanie addytywne przy wielu działaniach niepożądanych. Jak wynika z wyżej przedstawionych danych, nowe leki ukierunkowane molekularnie weszły już do praktyki klinicznej, ale są stosowane w monoterapii. Racjonalne wydają się jednak próby kojarzenia różnych postaci leczenia farmakologicznego w zaawansowanym raku płuca. Skojarzenie nowoczesnych metod leczenia farmakologicznego ma również uzasadnienie, jako uzupełnienie metod leczenia radykalnego opartego na radioterapii i chirurgii. Skojarzona terapia może być bardziej skuteczna, ponieważ oddziałuje na wiele procesów fizjologicznych (apoptoza, różnicowanie, angiogeneza, przerzutowanie, reakcja układu immunologicznego) oraz pozwala na użycie dużo mniejszych stężeń związków. Łączenie różnych metod leczenia, w tym opartego na klasycznej chemioterapii i lekach celowanych, pozwala przede wszystkim na przełamanie pierwotnej oporności komórek nowotworowych na pojedyncze leki, a także zmniejsza możliwość nabycia tej oporności. Tera-

bia wielolekowa ogranicza również niekorzystne skutki heterogenności nowotworu. W literaturze opisano liczne przykłady skojarzonego traktowania komórek NSCLC. Niektóre kombinacje związków są już w badaniach klinicznych, większość prób dotyczy połączenia inhibitorów kinaz tyrozynowych z klasycznymi cytostatykami.

Połączenie docetakselu z gefitynibem wykazywało synergistyczne działanie na komórki NSCLC, zarówno z mutacją receptora EGFR, jak i KRAS, co stwarza nadzieję na przełamanie oporności na leczenie guzów z mutacją KRAS [56]. Inną koncepcją oddziaływania na błonowe receptory o aktywności kinaz tyrozynowych jest blokowanie zewnątrzkomórkowej domeny przez fałszywe ligandy. Do tego typu leków należy necitumumab, przeciwciało monoklonalne blokujące aktywność receptora EGFR. Lek dopuszczono do użycia u chorych z płaskonabłonkowym NSCLC z obecnością przerzutów w połączeniu z cisplatyną i gemcytabiną [87]. Próbowano również określić skuteczność kojarzenia różnych typów inhibitorów kinaz tyrozynowych. Zbadano wpływ kombinacji afatynibu z cetuksymabem u pacjentów z mutacją EGFR, opornych na erlotynib i gefitynib [88]. Celem takiej kombinacji było nieodwracalnie zablokowanie receptora EGFR oraz innych członków rodziny receptorów EGFR. Koncepcja okazała się skuteczna również przy połączeniu erlotynibu z cetuksymabem, ponieważ ten zestaw leków spowodował wydłużenie życia pacjentów z dziką mutacją receptora EGFR oraz z nieznaną mutacją nowotworową [113]. Ważnym kierunkiem badań jest łączenie leków działających na różnych poziomach szlaku sygnałowego. W badaniu II fazy z wykorzystaniem erlotynibu oraz trametynibu, inhibitora receptora MET zaobserwowano wydłużenie życia i dobrą tolerancję tak połączonych leków przez chorych na NSCLC [93]. Kojarzenie inhibitorów kinaz przebadano również w odniesieniu do metod niefarmakologicznych. Skutecznym sposobem terapii może być dołączenie farmakoterapii do terapii fotodynamicznej, która jest w praktyce stosowana do leczenia paliatywnego zwężeń oskrzeli wywołanych przez NSCLC lub bardzo wczesnych raków płuca [99]. Wykazano, iż erlotynib wzmacnia skutek terapii fotodynamicznej [38]. Bardzo obiecujące wyniki badań dotyczą połączenia inhibitora BRAF dabrafenibu i inhibitora MEK trametynibu u chorych z NSCLC, których guzy wykazują mutację BRAF V600E [79].

Niektóre koncepcje łączenia leków ukierunkowanych molekularnie z innymi lekami nie znajdują potwierdzenia w praktyce klinicznej. Niepowodzeniem zakończyła się np. III faza badań klinicznych, w których użyto gefitynibu z cisplatyną i paklitakselem. Stwierdzono wytworzenie się chemiooporności z powodu aktywacji receptora IGF-1R [119]. Necitumumab jest również przykładem leku, który w badaniach klinicznych, wykazał skuteczność w ściśle określonym schemacie leczenia. Próba zastosowania w raku niepłaskonabłonkowym pemetreksedu i cisplatyny zakończyła się niepowodzeniem [75].

Dużą uwagę w kojarzeniu leków przeciwnowotworowych poświęca się lekom przeciwzapalnym i immunomodulującym. Ich działanie w takich kombinacjach ma przede wszystkim działanie proapoptotyczne i antyproliferacyjne. Większość takich połączeń jest obecnie w badaniach przedklinicznych. Kombinacja inhibitora COX-2 celekoksybu i sorafenibu znacznie hamowała proliferację komórek A549 przez zmniejszenie ekspresji surwiwiny i Bcl-2 oraz zahamowania fosforylacji kinaz MEK i ERK [118]. Antybiotyk klatrynomycyna, który również ma słabe działanie przeciwzapalne, wzmacniał cytotoksyczne działanie gefitynibu w komórkach NSCLC przez wpływ na proces autofagii [103]. Rapamycyna, stosowana jako lek immunosupresyjny w transplantologii, wzmacniała antyproliferacyjne działanie dasatinibu, inhibitora kinazy BCR/ABL i kinaz rodziny Src przez zahamowanie kinazy mTOR, odpowiedzialnej za regulację wzrostu, proliferację i ruchliwość komórek oraz Src, która pełni rolę białkowego produktu onkogenów komórkowych umiejscowionych w jądrze komórkowym [17]. Niesteroidowy lek przeciwzapalny sulindak w połączeniu z simwastatyną synergistycznie indukował apoptozę w komórkach A549 poprzez obniżenie ekspresji surwiwiny [59]. Kwas retinowy ATRA z genisteiną zmniejszał przerzutowy potencjał komórek A549 przez zahamowanie ekspresji białek powierzchniowych MUC1 i ICAM-1 [20]. 5-Fluorouracyl w połączeniu z kwasem gambogenik znacznie zwiększał kaspazozależną apoptozę jak i nekroptozę poprzez indukcję czynników ROS [102]. Beta-guttikalton (gambogic acid) wykazywał silne działanie synergiczne z cisplatyną *in vitro* oraz *in vivo* w wyniku zahamowania NF- κ B i MAPK [111]. Połączenie aspiryny z blokerem białek Bcl-2, ABT-737 zmieniło cytoprotekcyjne działanie procesu autofagii na indukujący śmierć komórek przez wpływ na kinazę MAPK p38 [117]. Inny inhibitor Bcl-2 AT101 wzmacniał antyproliferacyjne działanie cisplatyny zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Kombinacja tych substancji znajduje się w II fazie badań klinicznych [83].

PODSUMOWANIE

Zastosowanie leczenia celowanego lub ukierunkowanego molekularnie otwiera przed onkologią wiele nowych możliwości terapeutycznych charakteryzujących się zupełnie odmiennymi mechanizmami działania. Umożliwia osiągnięcie lepszych wyników w wyselekcjonowanych podgrupach chorych, stanowiących stosunkowo niewielki odsetek w ich ogólnej populacji. Obecnie leki ukierunkowane molekularnie można zaoferować kilkunastu procentom chorym na raka płuca. Z wyników badań zespołu prof. Krawczyka z Katedry i Kliniki Pneumologii Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie wynika, że w Polsce 10% pacjentów z tym nowotworem ma mutacje w genie *EGFR*, a rearanżację genu *ALK* stwierdza się prawie u 5% chorych i są to przede wszystkim pacjenci niepalący [62].

Rozwój wiedzy na temat raka płuca, nie prowadzi obecnie do powstawania kolejnych linii toksycz-

nych chemioterapeutyków, zmierza raczej w kierunku wybiórczego, celowanego, niekiedy skojarzonego leczenia tej choroby. Duży wybór leków celowanych umożliwia indywidualizację leczenia i wybór metody odpowiedniej do indywidualnego chorego. Nie można jednak pominąć faktu, że takie podejście wymaga szczegółowej oceny cech molekularnych raka u indywidualnych chorych. Większość leków celowanych jest stosowanych w ściśle wyselekcjonowanej populacji, ponieważ stosowane u niewyselekcjonowanej grupy pacjentów zazwyczaj nie wykazują znaczącego działania terapeutycznego. Istnienie czynników predykcyjnych odpowiedzi na terapię celowaną w NSCLC wymusza postęp w dziedzinie diagnostyki molekularnej, a jednocześnie „przenosi” metody badań molekularnych stosowane dotąd głównie w celach naukowych do praktyki klinicznej. W związku z tym powstaje wiele problemów związanych z wyborem najbardziej czułych i swoistych testów do oceny np. mutacji genu *EGFR* i odpowiedniej ich walidacji oraz certyfikowania laboratoriów diagnostycznych wykonujących badania na użytek kliniczny. Amerykańska Agencja FDA wraz z zatwierdzeniem leków ukierunkowanych molekularnie reguluje również zasady badań molekularnych dla potrzeb terapii celowanej. Przykładem tego jest zgoda FDA użycia metody oznaczania mutacji krążącego w osoczu genu *EGFR* pochodzącego z komórek guza [85]. Również w Polsce reguluje się metodologię badań molekularnych dla celów klinicznych i opracowuje stosowne wytyczne [62]. W wytycznych zwraca się uwagę nie tylko na zagadnienia techniczne oznaczania mutacji, ale również na ścisłą współpracę biologa molekularnego,

patologa i klinicyści w dostarczaniu odpowiedniego jakościowo i ilościowo materiału komórkowego lub tkankowego, odpowiedniej oceny przez patologa oraz czasu wykonania badania. Obecnie większość badań molekularnych wykonuje się na tkance lub komórkach NSCLC pozyskanych bezpośrednio z guza podczas zabiegów diagnostycznych lub terapeutycznych. Rozszerzenie panelu badań materiału tkankowego o diagnostykę molekularną wymusza na klinicyście uzyskanie większej niż dotychczas ilości materiału tkankowego, co jest trudne, a czasem nawet niemożliwe u osób z zaawansowanym nowotworem. Odpowiedzią na te problemy jest opracowanie metod „płynnej biopsji”, czyli pozyskiwanie krążącego DNA uwalnianego z komórek guza. Wspomniany wyżej test zaaprobowany przez FDA jest przykładem takiej metody. Wadą nowych leków, poza koniecznością zaawansowanych badań laboratoryjnych w celu selekcji pacjentów, jest również wysoka cena, odzwierciedlająca koszty licznych badań podstawowych, klinicznych, wreszcie kosztów produkcji związanych np. z tym, że niektóre nowe leki będą wymagać np. inżynierii genetycznej. Powoduje to wprowadzanie odrębnych analiz kosztowych terapii, co przedstawili z podaniem przykładów Larson i wsp. [24].

Pomimo wad terapii celowanej, wydaje się, że przyszłość onkologii opierać się będzie z pewnością na coraz liczniejszych lekach ukierunkowanych molekularnie. Taki dobór metod może zaowocować lepszymi wynikami i dalszym wydłużeniem życia pacjentów przy zminimalizowaniu groźnych objawów niepożądanych i zachowaniu dobrej jakości życia.

PISMIENICTWO

- [1] Alvarado D., Klein D.E., Lemmon M.A.: ErbB2 resembles an auto-inhibited invertebrate epidermal growth factor receptor. *Nature*, 2009; 461: 287-291
- [2] Amin D.N., Campbell M.R., Moasser M.M.: The role of HER3, the unpretentious member of the HER family, in cancer biology and cancer therapeutics. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2010; 21: 944-950
- [3] Anagnostou V.K., Lowery F.J., Zolota V., Tzelepi V., Gopinath A., Liceaga C., Panagopoulos N., Frangia K., Tanoue L., Boffa D., Gettinger S., Detterbeck F., Homer R.J., Dougenis D., Rimm D.L., Syrigos K.N.: High expression of BCL-2 predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer patients with non squamous histology. *BMC Cancer*, 2010; 10: 186
- [4] Azzoli C.G., Baker S. Jr., Temin S., Pao W., Aliff T., Brahmer J., Johnson D.H., Laskin J.L., Masters G., Milton D., Nordquist L., Pfister D.G., Piantadosi S., Schiller J.H., Smith R. i wsp.: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2009; 27: 6251-6266
- [5] Bae E.Y., Lee E.J., Kang H.G., Lee S.Y., Jin G., Lee W.K., Choi J.E., Jeon H.S., Lim J.O., Lee E.B., Park J.Y.: Polymorphisms in apoptosis-related genes and TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *J. Korean Med. Sci.*, 2011; 26: 1527-1530
- [6] Baines A.T., Xu D., Der C.J.: Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med. Chem.*, 2011; 3: 1787-1808
- [7] Banerji U., Camidge D.R., Verheul H.M., Agarwal R., Sarker D., Kaye S.B., Desai I.M., Timmer-Bonte J.N., Eckhardt S.G., Lewis K.D., Brown K.H., Cantarini M.V., Morris C., George S.M., Smith P.D., van Herpen C.M.: The first-in-human study of the hydrogen sulfate (Hyd-sulfate) capsule of the MEK1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886): a phase I open-label multicenter trial in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2010; 16: 1613-1623
- [8] Bell D.W., Gore I., Okimoto R.A., Godin-Heymann N., Sordella R., Mulloy R., Sharma S.V., Brannigan B.W., Mohapatra G., Settleman J., Haber D.A.: Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat. Genet.*, 2005; 37: 1315-1316
- [9] Blumenschein G.R. Jr., Smit E.F., Planchard D., Kim D.W., Cadranet J., De Pas T., Dunphy F., Udud K., Ahn M.J., Hanna N.H., Kim J.H., Mazieres J., Kim S.W., Baas P., Rappold E. i wsp.: A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann. Oncol.*, 2015; 26: 894-901
- [10] Bravaccini S., Tumedei M.M., Ulivi P., Zoli W., Calistri D., Candoli P., Amadori D., Puccetti M.: ALK translocation detection in non-small cell lung cancer cytological samples obtained by TBNA or EBUS-TBNA. *Cytopathology*, 2016; 27: 103-107
- [11] Brustugun O.T., Khattak A.M., Tromborg A.K., Beigi M., Beiske K., Lund-Iversen M., Helland A.: BRAF-mutations in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2014; 84: 36-38

- [12] Butkiewicz D., Krześniak M., Drosik A., Giglok M., Gdowicz-Kłosok A., Kosarewicz A., Rusin M., Maslyk B., Gawkowska-Suwińska M., Suwiński R.: The VEGFR2, COX-2 and MMP-2 polymorphisms are associated with clinical outcome of patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, 2015; 137: 2332-2342
- [13] Calles A., Kwiatkowski N., Cammarata B.K., Ercan D., Gray N.S., Jänne P.A.: Tivantinib (ARQ 197) efficacy is independent of MET inhibition in non-small-cell lung cancer cell lines. *Mol. Oncol.*, 2015; 9: 260-269
- [14] Cancer Facts & Figures 2014. [http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014/\(01.12.2015\)](http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014/(01.12.2015))
- [15] Cardarella S., Ogino A., Nishino M., Butaney M., Shen J., Lydon C., Yeap B.Y., Sholl L.M., Johnson B.E., Jänne P.A.: Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2013; 19: 4532-4540
- [16] Chansky K., Sculier J.P., Crowley J.J., Giroux D., Van Meerbeeck J., Goldstraw P.: The International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project: prognostic factors and pathologic TNM stage in surgically managed non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 2009; 4: 792-801
- [17] Chen B., Xu X., Luo J., Wang H., Zhou S.: Rapamycin enhances the anti-cancer effect of dasatinib by suppressing Src/PI3K/mTOR pathway in NSCLC cells. *PLoS One*, 2015; 10: e0129663
- [18] Chen D., Zhang L.Q., Huang J.F., Liu K., Chuai Z.R., Yang Z., Wang Y.X., Shi D.C., Liu Q., Huang Q., Fu W.L.: BRAF mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2014; 9: e101354
- [19] Chen L., He Y., Huang H., Liao H., Wei W.: Selective COX-2 inhibitor celecoxib combined with EGFR-TKI ZD1839 on non-small cell lung cancer cell lines: in vitro toxicity and mechanism study. *Med. Oncol.*, 2008; 25: 161-171
- [20] Cheng J., Qi J., Li X.T., Zhou K., Xu J.H., Zhou Y., Zhang G.Q., Xu J.P., Zhou R.J.: ATRA and genistein synergistically inhibit the metastatic potential of human lung adenocarcinoma cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015; 8: 4220-4227
- [21] Cheng L., Alexander R.E., MacLennan G.T., Cummings O.W., Montironi R., Lopez-Beltran A., Cramer H.M., Davidson D.D., Zhang S.: Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod. Pathol.*, 2012; 25: 347-369
- [22] Christensen J.G., Zou H.Y., Arango M.E., Li Q., Lee J.H., McDonnell S.R., Yamazaki S., Alton G.R., Mroczkowski B., Los G.: Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol. Cancer Ther.*, 2007; 6: 3314-3322
- [23] Ciardiello F., Caputo R., Bianco R., Damiano V., Pomato G., De Placido S., Bianco A.R., Tortora G.: Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 2053-2063
- [24] Cost-Utility Analysis of Treatments for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. http://www.ajpb.com/journals/ajpb/2015/ajpb_novemberdecember2015/cost-utility-analysis-of-treatments-for-advanced-non-small-cell-lung-cancer (03.01.2016)
- [25] Courtney K.D., Corcoran R.B., Engelman J.A.: The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28: 1075-1083
- [26] Czyżykowski R., Połowinczak-Przybyłek J., Potemski P.: Nicotine-induced resistance of non-small cell lung cancer to treatment – possible mechanisms. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2016; 70: 186-193
- [27] d'Amato T.A., Landreneau R.J., McKenna R.J., Santos R.S., Parker R.J.: Prevalence of in vitro extreme chemotherapy resistance in resected non-small-cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.*, 2006; 81: 440-446
- [28] Dasari A., Gore L., Messersmith W.A., Diab S., Jimeno A., Weekes C.D., Lewis K.D., Drabkin H.A., Flaig T.W., Camidge D.R.: A phase I study of sorafenib and vorinostat in patients with advanced solid tumors with expanded cohorts in renal cell carcinoma and non-small cell lung cancer. *Invest. New Drugs*, 2013; 31: 115-125
- [29] De Luca A., Carotenuto A., Rachiglio A., Gallo M., Maiello M.R., Aldinucci D., Pinto A., Normanno N.: The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment. *J. Cell Physiol.*, 2008; 214: 559-567
- [30] DeSantis C.E., Lin C.C., Mariotto A.B., Siegel R.L., Stein K.D., Kramer J.L., Alteri R., Robbins A.S., Jemal A.: Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.*, 2014; 64: 252-271
- [31] Dimou A., Non L., Chae Y.K., Tester W.J., Syrigos K.N.: MET gene copy number predicts worse overall survival in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC); a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2014; 9: e107677
- [32] Dingemans A.M., Mellema W.W., Groen H.J., van Wijk A., Burgers S.A., Kunst P.W., Thunnissen E., Heideman D.A., Smit E.F.: A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIb or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. *Clin. Cancer Res.*, 2013; 19: 743-751
- [33] El-Chaar N.N., Piccolo S.R., Boucher K.M., Cohen A.L., Chang J.T., Moos P.J., Bild A.H.: Genomic classification of the RAS network identifies a personalized treatment strategy for lung cancer. *Mol. Oncol.*, 2014; 8: 1339-1354
- [34] Ettinger D.S., Akerley W., Bepler G., Blum M.G., Chang A., Cheney R.T., Chirieac L.R., D'Amico T.A., Demmy T.L., Ganti A.K., Govindan R., Grannis F.W. Jr., Jahan T., Jahanzeb M., Johnson D.H. i wsp.: Non-small cell lung cancer. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, 2010; 8: 740-801
- [35] European Medicines Agency: Advexin – Product Information. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000919/wapp/Initial_authorisation/human_wapp_000042.jsp (13.06.2016)
- [36] European Medicines Agency: Tagrisso – Product Information. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/004124/human_med_001961.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 (15.06.2016)
- [37] FDA Approval for Afatinib Dimaleate. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-afatinibdimaleate> (05.12.2015)
- [38] FDA Approval for Ceritinib – National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-ceritinib> (05.12.2015)
- [39] FDA Approval for Crizotinib. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-crizotinib> (05.12.2015)
- [40] FDA Approval for Erlotinib Hydrochloride – National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-erlotinib-hydrochloride> (05.12.2015)
- [41] FDA Approval for Gefitinib. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-gefitinib> (05.12.2015)
- [42] Gadgeel S.M., Gandhi L., Rieley G.J., Chiappori A.A., West H.L., Azada M.C., Morcos P.N., Lee R.M., Garcia L., Yu L., Boissier F., Di Laurenzio L., Golding S., Sato J., Yokoyama S., Tanaka T., Ou S.H.: Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol.*, 2014; 15: 1119-1128
- [43] Gautschi O., Milia J., Cabarro B., Bluthgen M.V., Besse B., Smit E.F., Wolf J., Peters S., Früh M., Koeberle D., Oulkhovir Y., Schuler M., Curioni-Fontecedro A., Huret B., Kerjovan M. i wsp.: Targeted therapy for patients with BRAF-mutant lung cancer: results from the European EURAF cohort. *J. Thorac. Oncol.*, 2015; 10: 1451-1457
- [44] Gazdar A.F., Shigematsu H., Herz J., Minna J.D.: Mutations and addition to EGFR: the Achilles' heel of lung cancers? *Trends. Mol. Med.*, 2004; 10: 481-486
- [45] Goffin J., Lacchetti C., Ellis P.M., Ung Y.C., Evans W.K.: First-line

systemic chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a systematic review. *J. Thorac. Oncol.*, 2010; 5: 260-274

- [46] Gridelli C., Peters S., Sgambato A., Casaluce F., Adjei A.A., Ciardiello F.: ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat. Rev.*, 2014; 40: 300-306
- [47] Hames M.L., Chen H., Iams W., Aston J., Lovly C.M., Horn L.: Correlation between KRAS mutation status and response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2016; 92: 29-34
- [48] Han J.Y., Park K., Kim S.W., Lee D.H., Kim H.Y., Kim H.T., Ahn M.J., Yun T., Ahn J.S., Suh C., Lee J.S., Yoon S.J., Han J.H., Lee J.W., Jo S.J., Lee J.S.: First-SIGNAL: first-line single-agent icressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *J. Clin. Oncol.*, 2012; 30: 1122-1128
- [49] Hecht S.S.: Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *Int. J. Cancer*, 2012, 131: 2724-2732
- [50] Heist R.S., Wang X., Hodgson L., Otterson G.A., Stinchcombe T.E., Gandhi L., Villalona-Calero M.A., Watson P., Vokes E.E., Socinski M.A., Alliance for Clinical Trials in Oncology: CALGB 30704 (Alliance): a randomized phase II study to assess the efficacy of pemetrexed or sunitinib or pemetrexed plus sunitinib in the second-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 2014, 9: 214-221
- [51] Herbst R.S.: Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2004; 59: 21-26
- [52] Hirsh V., Cadranel J., Cong X.J., Fairclough D., Finncern H.W., Lawrence R.M., Miller V.A., Palmer M., Yang J.C.: Symptom and quality of life benefit of afatinib in advanced non-small-cell lung cancer patients previously treated with erlotinib or gefitinib: results of a randomized phase IIb/III trial (LUX-Lung 1). *J. Thorac. Oncol.*, 2013; 8: 229-237
- [53] Hynes N.E., Lane H.A.: ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, 2005; 5: 341-354
- [54] Iacono D., Chiari R., Metro G., Bennati C., Bellezza G., Cenci M., Ricciuti B., Sidoni A., Baglivo S., Minotti V., Crinò L.: Future options for ALK-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2015; 87: 211-219
- [55] Javid J., Mir R., Mirza M., Imtiyaz A., Prasant Y., Mariyam Z., Julka P.K., Mohan A., Lone M., Ray P.C., Saxena A.: CC genotype of anti-apoptotic gene BCL-2 (-938 C/A) is an independent prognostic marker of unfavorable clinical outcome in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin. Transl. Oncol.*, 2015; 17: 289-295
- [56] Jiang H., Zhao P.J., Su D., Feng J., Ma S.L.: Paris saponin I induces apoptosis via increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 expression in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Mol. Med. Rep.*, 2014; 9: 2265-2272
- [57] Jorissen R.N., Walker F., Pouliot N., Garrett T.P., Ward C.W., Burgess A.W.: Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.*, 2003; 284: 31-53
- [58] Karachaliou N., Mayo C., Costa C., Magri I., Gimenez-Capitan A., Molina-Vila M.A., Rosell R.: KRAS mutations in lung cancer. *Clin. Lung Cancer*, 2013; 14: 205-214
- [59] Kim Y.S., Seol C.H., Jung J.W., Oh S.J., Hwang K.E., Kim H.J., Jeong E.T., Kim H.R.: Synergistic effect of sulindac and simvastatin on apoptosis in lung cancer A549 cells through AKT-dependent downregulation of survivin. *Cancer Res. Treat.*, 2015; 47: 90-100
- [60] Kobayashi S., Boggon T.J., Dayaram T., Jänne P.A., Kocher O., Meyerson M., Johnson B.E., Eck M.J., Tenen D.G., Halmos B.: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 352: 786-792
- [61] Kowalczyk A., Szutowicz-Zielińska E., Dziadziuszko R., Jassem J.: Znaczenie inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca. *Onkologia w Praktyce Klinicznej*, 2005; 1: 217-224
- [62] Krawczyk P., Chorostowska-Wynimko J., Dziadziuszko R., Jassem J., Krzakowski M., Langfort R., Puacz E., Wasąg B., Wojas-Krawczyk K.: Zalecenia metodyczne dotyczące oceny mutacji genu EGFR oraz rearanżacji genu ALK w kwalifikacji chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca do terapii ukierunkowanych molekularnie. *Nowotwory*, 2014; 64: 336-342
- [63] Krzakowski M., Jassem J., Dziadziuszko R., Kowalski D.M., Olszewski W., Orłowski T., Rzyman W., Smorczevska M.: Nowotwory płuca i opłucnej oraz śródpiersia. W: Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych 2013, t. 1, Via Medica, Gdańsk 2013, 69-101
- [64] Lenferink A.E., Pinkas-Kramarski R., van de Poll M.L., van Vugt M.J., Klapper L.N., Tzahar E., Waterman H., Sela M., van Zoelen E.J., Yarden Y.: Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J.*, 1998; 17: 3385-3397
- [65] Li G., Zhao J., Peng X., Liang J., Deng X., Chen Y.: Radiation/paclitaxel treatment of p53-abnormal non-small cell lung cancer xenograft tumor and associated mechanism. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2012; 27: 227-233
- [66] Lockhart A.C., Liu Y., Dehdashti F., Laforest R., Picus J., Frye J., Trull L., Belanger S., Desai M., Mahmood S., Mendell J., Welch M.J., Siegel B.A.: Phase 1 evaluation of [(64)Cu]DOTA-patritumab to assess dosimetry, apparent receptor occupancy, and safety in subjects with advanced solid tumors. *Mol. Imaging Biol.*, 2016; 18: 446-453
- [67] Ma P.C.: Personalized targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Cleve. Clin. J. Med.*, 2012; 79: eS56-eS60
- [68] Mao C., Qiu L.X., Liao R.Y., Du F.B., Ding H., Yang W.C., Li J., Chen Q.: KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer*, 2010; 69: 272-278
- [69] Marsit C.J., Zheng S., Aldape K., Hinds P.W., Nelson H.H., Wiencke J.K., Kelsey K.T.: PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Hum. Pathol.*, 2005; 36: 768-776
- [70] Mendell J., Freeman D.J., Feng W., Hettmann T., Schneider M., Blum S., Ruhe J., Bange J., Nakamaru K., Chen S., Tsuchihashi Z., von Pawel J., Copigneaux C., Beckman R.A.: Clinical translation and validation of a predictive biomarker for patritumab, an anti-human epidermal growth factor receptor 3 (HER3) monoclonal antibody, in patients with advanced non-small cell lung cancer. *EBioMedicine*, 2015; 2: 264-271
- [71] Mitsudomi T., Morita S., Yatabe Y., Negoro S., Okamoto I., Tsurutani J., Seto T., Satouchi M., Tada H., Hirashima T., Asami K., Katakami N., Takada M., Yoshioka H., Shibata K. i wsp.: Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJ-TOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.*, 2010; 11: 121-128
- [72] Mok T.S., Wu Y.L., Thongprasert S., Yang C.H., Chu D.T., Saijo N., Sunpaweravong P., Han B., Margono B., Ichinose Y., Nishiwaki Y., Ohe Y., Yang J.J., Chewaskulyong B., Jiang H. i wsp.: Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 2009; 361: 947-957
- [73] Montani F., Marzi M.J., Dezi F., Dama E., Carletti R.M., Bonizzi G., Bertolotti R., Bellomi M., Rampinelli C., Maisonneuve P., Spaggiari L., Veronesi G., Nicassio F., Di Fiore P.P., Bianchi F.: miR-Test: a blood test for lung cancer early detection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2015; 107: djv063
- [74] Nyati M.K., Morgan M.A., Feng F.Y., Lawrence T.S.: Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2006; 6: 876-885
- [75] Paz-Ares L., Mezger J., Ciuleanu T.E., Fischer J.R., von Pawel J., Provencio M., Kazarnowicz A., Losonczy G., de Castro G. Jr., Szczesna A., Crino L., Reck M., Ramlau R., Ulsperger E., Schumann C. i wsp.: Nectinmab plus pemetrexed and cisplatin as first-line therapy

in patients with stage IV non-squamous non-small-cell lung cancer (INSPIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.*, 2015; 16: 328-337

[76] Peng Z.: Current status of genicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum. Gene Ther.*, 2005; 16: 1016-1027

[77] Petersen I.: The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Dtsch. Arztebl. Int.*, 2011; 108: 525-531

[78] Pirker R., Herth F.J., Kerr K.M., Filipits M., Taron M., Gandara D., Hirsch F.R., Grunenwald D., Popper H., Smit E., Dietel M., Marchetti A., Manegold C., Schirmacher P., Thomas M. i wsp.: Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J. Thorac. Oncol.*, 2010; 5: 1706-1713

[79] Planchard D., Kim T.M., Mazieres J., Quoix E., Riely G., Barlesi F., Souquet P.J., Smit E.F., Groen H.J., Kelly R.J., Cho B.C., Socinski M.A., Pandite L., Nase C., Ma B. i wsp.: Dabrafenib in patients with BRAF^{V600E}-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.*, 2016; 17: 642-650

[80] Porebska I., Wyrodek E., Kosacka M., Adamiak J., Jankowska R., Harlozinska-Szymrka A.: Apoptotic markers p53, Bcl-2 and Bax in primary lung cancer. *In Vivo*, 2006; 20: 599-604

[81] Pylayeva-Gupta Y., Grabocka E., Bar-Sagi D.: RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer*, 2011; 11: 761-774

[82] Reck M., van Zandwijk N., Gridelli C., Baliko Z., Rischin D., Allan S., Krzakowski M., Heigener D.: Erlotinib in advanced non-small cell lung cancer: efficacy and safety findings of the global phase IV Tarceva Lung Cancer Survival Treatment study. *J. Thorac. Oncol.*, 2010; 5: 1616-1622

[83] Ren T., Shan J., Li M., Qing Y., Qian C., Wang G., Li Q., Lu G., Li C., Peng Y., Luo H., Zhang S., Yang Y., Cheng Y., Wang D., Zhou S.F.: Small-molecule BH3 mimetic and pan-Bcl-2 inhibitor AT-101 enhances the antitumor efficacy of cisplatin through inhibition of APE1 repair and redox activity in non-small-cell lung cancer. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2015; 9: 2887-2910

[84] Research C.f.D.E.a.: Approved Drugs – Alectinib. <http://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm476946.htm> (19.06.2016)

[85] Research C.f.D.E.a.: Approved Drugs – Cobas EGFR Mutation Test v2. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/Approved-Drugs/ucm504540.htm> (19.06.2016)

[86] Research C.f.D.E.a.: Approved Drugs – FDA Approves Crizotinib Capsules. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm490391.htm> (19.06.2016)

[87] Research C.f.D.E.a.: Drug Approvals and Databases – Drug Trials Snapshots: PORTRAZZA. <http://www.fda.gov/drugs/informationon-drugs/ucm483844.htm> (19.06.2016)

[88] Ribeiro Gomes J., Cruz M.R.: Combination of afatinib with cetuximab in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer resistant to EGFR inhibitors. *Onco. Targets Ther.*, 2015; 8: 1137-1142

[89] Roengvoraphoj M., Tsongalis G.J., Dragnev K.H., Rigas J.R.: Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small cell lung cancer: focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients. *Cancer Treat. Rev.*, 2013; 39: 839-850

[90] Rosell R., Carcereny E., Gervais R., Vergnenegre A., Massuti B., Felip E., Palmero R., Garcia-Gomez R., Pallares C., Sanchez J.M., Porta R., Cobo M., Garrido P., Longo F., Moran T. i wsp.: Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.*, 2012; 13: 239-246

[91] Roth J.A., Nguyen D., Lawrence D.D., Kemp B.L., Carrasco C.H., Ferson D.Z., Hong W.K., Komaki R., Lee J.J., Nesbitt J.C., Pisters K.M.,

Putnam J.B., Schea R., Shin D.M., Walsh G.L. i wsp.: Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat. Med.*, 1996; 2: 985-991

[92] Scheffler M., Bos M., Gardizi M., König K., Michels S., Fassunke J., Heydt C., Künstlinger H., Ihle M., Ueckerth F., Albus K., Serke M., Gerigk U., Schulte W., Töpelt K. i wsp.: PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget*, 2015; 6: 1315-1326

[93] Sequist L.V., von Pawel J., Garmey E.G., Akerley W.L., Brugger W., Ferrari D., Chen Y., Costa D.B., Gerber D.E., Orlov S., Ramlau R., Arthur S., Gorbachevsky I., Schwartz B., Schiller J.H.: Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2011; 29: 3307-3315

[94] Sequist L.V., Yang J.C., Yamamoto N., O'Byrne K., Hirsh V., Mok T., Geater S.L., Orlov S., Tsai C.M., Boyer M., Su W.C., Bennouna J., Kato T., Gorbunova V., Lee K.H., Shah R. i wsp.: Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexid in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.*, 2013; 31: 3327-3334

[95] Shepherd F.A., Rodrigues Pereira J., Ciuleanu T., Tan E.H., Hirsh V., Thongprasert S., Campos D., Maoleekoonpiroj S., Smylie M., Martins R., van Kooten M., Dediu M., Findlay B., Tu D., Johnston D. i wsp.: Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 353: 123-132

[96] Shigematsu H., Takahashi T., Nomura M., Majmudar K., Suzuki M., Lee H., Wistuba II, Fong K.M., Toyooka S., Shimizu N., Fujisawa T., Minna J.D., Gazdar A.F.: Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 2005; 65: 1642-1646

[97] Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A.: Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.*, 2014; 64: 9-29

[98] Siegelin M.D., Borczuk A.C.: Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. *Lab. Invest.*, 2014; 94: 129-137

[99] Simone C.B. 2nd, Friedberg J.S., Glatstein E., Stevenson J.P., Sterman D.H., Hahn S.M., Cengel K.A.: Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.*, 2012; 4: 63-75

[100] Sirotnak F.M.: Studies with ZD1839 in preclinical models. *Semin. Oncol.*, 2003; 30: 12-20

[101] Soria J.C., Mok T.S., Cappuzzo F., Jänne P.A.: EGFR-mutated oncogene-addicted non-small cell lung cancer: current trends and future prospects. *Cancer Treat. Rev.*, 2012; 38: 416-430

[102] Su J., Cheng H., Zhang D., Wang M., Xie C., Hu Y., Chang H.C., Li Q.: Synergistic effects of 5-fluorouracil and gambogic acid on A549 cells: activation of cell death caused by apoptotic and necroptotic mechanisms via the ROS-mitochondria pathway. *Biol. Pharm. Bull.*, 2014; 37: 1259-1268

[103] Sugita S., Ito K., Yamashiro Y., Moriya S., Che X.F., Yokoyama T., Hiramoto M., Miyazawa K.: EGFR-independent autophagy induction with gefitinib and enhancement of its cytotoxic effect by targeting autophagy with clarithromycin in non-small cell lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015; 461: 28-34

[104] Toh C.K., Gao F., Lim W.T., Leong S.S., Fong K.W., Yap S.P., Hsu A.A., Eng P., Koong H.N., Thirugnanam A., Tan E.H.: Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *J. Clin. Oncol.*, 2006; 24: 2245-2251

[105] Tokumo M., Toyooka S., Kiura K., Shigematsu H., Tomii K., Aoe M., Ichimura K., Tsuda T., Yano M., Tsukuda K., Tabata M., Ueoka H., Tanimoto M., Date H., Gazdar A.F., Shimizu N.: The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 1167-1173

[106] Torok S., Hegedus B., Laszlo V., Hoda M.A., Ghanim B., Berger W., Klepetko W., Dome B., Ostoros G.: Lung cancer in never smokers. *Future Oncol.*, 2011; 7: 1195-1211

- [107] Travis W.D., Brambilla E., Noguchi M., Nicholson A.G., Geisinger K.R., Yatabe Y., Beer D.G., Powell C.A., Riely G.J., Van Schil P.E., Garg K., Austin J.H., Asamura H., Rusch V.W., Hirsch F.R. i wsp.: International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.*, 2011; 6: 244-285
- [108] Tsao M.S., Sakurada A., Cutz J.C., Zhu C.Q., Kamel-Reid S., Squire J., Lorimer I., Zhang T., Liu N., Daneshmand M., Marrano P., da Cunha Santos G., Lagarde A., Richardson F., Seymour L. i wsp.: Erlotinib in lung cancer – molecular and clinical predictors of outcome. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 353: 133-144
- [109] Umelo I., Noeparast A., Chen G., Renard M., Geers C., Vansteenkiste J., Giron P., De Wever O., Teugels E., De Grève J.: Identification of a novel HER3 activating mutation homologous to EGFR-L858R in lung cancer. *Oncotarget*, 2016; 7: 3068-3083
- [110] Vallee A., Sagan C., Le Loupp A.G., Bach K., Dejoie T., Denis M.G.: Detection of EGFR gene mutations in non-small cell lung cancer: lessons from a single-institution routine analysis of 1,403 tumor samples. *Int. J. Oncol.*, 2013; 43: 1045-1051
- [111] Wang L.H., Li Y., Yang S.N., Wang F.Y., Hou Y., Cui W., Chen K., Cao Q., Wang S., Zhang T.Y., Wang Z.Z., Xiao W., Yang J.Y., Wu C.F.: Gambogic acid synergistically potentiates cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through suppressing NF- κ B and MAPK/HO-1 signalling. *Br. J. Cancer*, 2014; 110: 341-352
- [112] Wang W.L., Tang Z.H., Xie T.T., Xiao B.K., Zhang X.Y., Guo D.H., Wang D.X., Pei F., Si H.Y., Zhu M.: Efficacy and safety of sorafenib for advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014; 15: 5691-5696
- [113] Wheler J.J., Tsimberidou A.M., Falchook G.S., Zinner R.G., Hong D.S., Fok J.Y., Fu S., Piha-Paul S.A., Naing A., Kurzrock R.: Combining erlotinib and cetuximab is associated with activity in patients with non-small cell lung cancer (including squamous cell carcinomas) and wild-type EGFR or resistant mutations. *Mol. Cancer Ther.*, 2013; 12: 2167-2175
- [114] WHO | Cancer. WHO; [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/\(10.11.2015\)](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/(10.11.2015))
- [115] Wu X., Zhao H., Suk R., Christiani D.C.: Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene*, 2004; 23: 6500-6523
- [116] Yokouchi H., Kanazawa K.: Revisiting the role of COX-2 inhibitor for non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.*, 2015; 4: 660-664
- [117] Zhang C., Shi J., Mao S.Y., Xu Y.S., Zhang D., Feng L.Y., Zhang B., Yan Y.Y., Wang S.C., Pan J.P., Yang Y.P., Lin N.M.: Role of p38 MAPK in enhanced human cancer cells killing by the combination of aspirin and ABT-737. *J. Cell Mol. Med.*, 2015; 19: 408-417
- [118] Zhang H., Li Z., Wang K.: Combining sorafenib with celecoxib synergistically inhibits tumor growth of non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.*, 2014; 31: 1954-1960
- [119] Zhang J., Gold K.A., Kim E.: Sorafenib in non-small cell lung cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2012; 21: 1417-1426
- [120] Zhang J., Wang S., Wang L., Wang R., Chen S., Pan B., Sun Y., Chen H.: Prognostic value of Bcl-2 expression in patients with non-small-cell lung cancer: a meta-analysis and systemic review. *Oncol. Targets Ther.*, 2015; 8: 3361-3369

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

Synergistic activity of sorafenib and betulinic acid against clonogenic activity of non-small cell lung cancer cells

Justyna Kutkowska, Leon Strzadala and Andrzej Rapak 

Department of Experimental Oncology, Ludwik Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy Polish Academy of Science, Wroclaw, Poland

Key words

Betulinic acid, clonogenic activity, combination therapy, non-small cell lung cancer, sorafenib

Correspondence

Andrzej Rapak, Department of Experimental Oncology, Ludwik Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy Polish Academy of Science, Weigla 12, 53-114 Wroclaw, Poland.
Tel: +48 71 337 1172; Fax +48 71 337 2171;
E-mail: rapak@iitd.pan.wroc.pl

Funding Information

Polish Academy of Sciences, (Grant/Award Number: ' no 03/2016')

Received May 26, 2017; Revised August 4, 2017; Accepted August 21, 2017

Cancer Sci 108 (2017) 2265–2272

doi: 10.1111/cas.13386

The highly selective multi-targeted agent sorafenib is an inhibitor of a number of intracellular signaling kinases with anti-proliferative, anti-angiogenic and pro-apoptotic effects in various types of tumors, including human non-small cell lung cancer (NSCLC). Betulin displays a broad spectrum of biological and pharmacological properties, including anticancer and chemopreventive activity. Combination of drugs with different targets is a logical approach to overcome multilevel cross-stimulation among key signaling pathways in NSCLC progression. NSCLC cell lines, A549, H358 and A427, with different KRAS mutations, and normal human peripheral blood lymphocyte cells, were treated with sorafenib and betulinic acid alone and in combination. We examined the effect of different combined treatments on viability (MTS test), proliferation and apoptotic susceptibility based on flow cytometry, alterations in signaling pathways by western blotting and colony-forming ability. The combination of sorafenib with betulinic acid had a strong effect on the induction of apoptosis of different NSCLC cell lines. In addition, this combination was not toxic for human peripheral blood lymphocytes. Combination treatment changed the expression of proteins involved in the mitochondrial apoptosis pathway and induced apoptotic death by caspase activation. Importantly, combination treatment with low drug concentrations tremendously reduced the colony-forming ability of A549, H358 and A427 cells, as compared to both compounds alone. In this study, we showed that combination therapy with low concentrations of sorafenib and betulinic acid had the capacity to induce high levels of cell death and abolish clonogenic activity in some NSCLC cell lines regardless of KRAS mutations.

Lung cancer is the second leading cause of cancer-related mortality worldwide, and more than 1.6 million cases are diagnosed every year.^(1,2) Tobacco smoking and exposure to environmental carcinogens have been found to be the major risk factors in the development of this disease.⁽³⁾ Lung cancer can be classically subdivided into small cell lung cancer (SCLC) and three types of non-small cell lung cancer (NSCLC) that include squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and large cell carcinoma.⁽¹⁾ Most lung cancer patients are diagnosed at an advanced stage, with a short survival rate.⁽⁴⁾ Despite considerable advances in our knowledge and experience in the treatment of lung cancer patients, our capacity to effectively fight and treat this disease is still limited. One way to improve these results is to personalize treatment based on tumor molecular characteristics.^(4,5)

Molecular targeted therapies are currently applied in the treatment regimen of NSCLC, because they have been shown to extend progression-free survival and improve overall survival.⁽⁶⁾ Molecular biomarkers, such as epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations or amplification,⁽⁷⁾ echinoderm microtubule-associated protein-like 4-naplastic lymphoma kinase (EML4-ALK) translocation⁽⁸⁾ or KRAS⁽⁹⁾ and PI3KCA

mutations,⁽¹⁰⁾ can serve as targets for these therapies, and also as indicators of therapeutic outcomes.

Sorafenib is a multi-targeted kinase inhibitor that has shown efficacy against a wide variety of tumors in preclinical models.⁽¹¹⁾ The anti-tumor effect of sorafenib is thought to be mediated through its inhibition of the RAS/RAF/ERK pathway involved in cell proliferation as well as its inhibition of VEGFR2-related angiogenesis.⁽¹²⁾ It has also been reported that sorafenib induces apoptosis in human leukemia cells and other human tumor cell lines through translation inhibition and downregulation of myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) and a Bcl-2 family member.⁽¹³⁾ Sorafenib has demonstrated anti-tumor activity in phase I and II trials as monotherapy^(14,15) and combined treatment^(16,17) in patients with advanced NSCLC. However, sorafenib in combination with cytotoxic agents for the treatment of NSCLC patients failed to demonstrate significant survival benefit in phase III studies.⁽¹⁸⁾ Until now, the precise molecular mechanisms that account for this phenomenon have remained unclear.⁽¹⁹⁾

Novel medicinal lead compounds are sought by assaying large compound collections that can be retrieved from natural sources or produced by synthetic chemistry or

biotransformation.⁽²⁰⁾ Natural substances derived mostly from plants provide an excellent platform for new drug discovery. Plant pentacyclic lupane-type triterpenes, such as betulin and betulinic acid, are recognized as chemopreventive agents and are believed to be pharmacologically harmless. Betulinic acid, discovered in 1995 in the stem bark of the plant *Zizyphus mauritiana*, has been experimentally evaluated for its multiple biological activities.^(21,22) Previously reported *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that these compounds have anti-tumor and antiproliferative properties, and induce apoptosis in various tumor cells.^(23–25) Apoptosis is accompanied by caspase activation, mitochondrial membrane alterations and DNA fragmentation.⁽²⁶⁾ Thus far, betulinic acid and other betulin derivatives have been poorly explored against NSCLC,^(23,27,28) but many new studies have shown that they have a potential role in anti-cancer therapy.^(29–32)

Recently, studies have shown that a combination of different drugs in tumor patient therapies may increase the efficiency of antitumor response. Combining drugs with different targets is a logical approach to overcome multilevel cross-stimulation among key pathways in NSCLC progression. In the present study, we hypothesized that combined treatment of sorafenib and betulinic acid could enhance the inhibitory effect on NSCLC cells.

Materials and Methods

Cell culture and reagents. The NSCLC lines, with different KRAS mutations A549 (p.G12S), H358 (p.G12C) and A427 (p.G12D) were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured in recommended growth media with 10% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). All cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The cells were seeded at densities of 1 × 10⁴ cells/0.1 mL (0.32 cm²) (cell viability assay), 6 × 10⁴ cells/0.5 mL (1.9 cm²) (flow cytometry), 1 × 10⁵ cells/3 mL (9.5 cm²) (long-term colony formation assay, serial replating assay) and 1 × 10⁶ cells/4 mL (21 cm²) (western blotting). The cells were treated with sorafenib (1.3 µg/mL; LC Laboratories), betulinic acid (3 µg/mL; Sigma-Aldrich Chemistry), and both sorafenib and betulinic acid at 1 day post-seeding. Three days later, the cells were collected for an appropriate assay.

Cell viability assay. Cell viability was assessed by CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. Each treatment within a single experiment was performed in triplicate. Absorbance at 490 nm was recorded by a Wallac 1420 VICTOR2 plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Data were normalized to untreated control.

Proliferation assay. Cell labeling with CellTrace Far Red was performed according to the protocols provided by the manufacturer (CellTrace Far Red Cell Proliferation Kit, Invitrogen, Molecular Probes, USA). The compound was dissolved in dry DMSO to make a 5-mM stock solution stored at –20°C until use. Seeded cells were suspended in 1 mL PBS and 1 µL of CellTrace Far Red stock solution was added to a final concentration of 5 µM. Cells were incubated at 37°C and protected from light for 20 min. The cells were washed with warm PBS (with Ca²⁺ and Mg²⁺) and after 1 h in new clean medium, cells were treated with drugs. CellTrace Far Red produces a stable and well retained fluorescent signal with very little variance

between cells within generations, allowing visualization of proliferating cells for up to eight generations. When cells were dividing, CellTrace Far Red distributed equally into daughter cells. Data was acquired on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using Flowing Software 2.5.1 (Perttu Terho, Turku, Finland).

Annexin V staining. Apoptosis was assessed using an Annexin V Apoptosis Detection Kit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, the cells were stained with Annexin V-FITC (8 µg/mL) and PI (5 µg/mL) for 15 min at room temperature (RT) in the dark. In between steps, the cells were washed with cold PBS (with Ca²⁺ and Mg²⁺) containing 2.5% FBS. Data was acquired on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using Flowing Software 2.5.1 (Perttu Terho, Turku, Finland). Apoptosis was quantified as a percentage of both Annexin V-positive and Annexin V/PI-double-positive cells.

Western blotting. Whole cell lysates were prepared using cold RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1% SDS) supplemented with SigmaFAST Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) and Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific). The cell lysates were then sonicated for 10 s at 100% power using a Sonopuls HD 2070 ultrasonic homogenizer (Bandelin, Berlin, Germany) and centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C to pellet cellular debris. Protein concentration was determined using a Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Absorbance at 570 nm was recorded by a Wallac 1420 VICTOR2 plate reader. Cell lysates with Laemmli sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 0.05% bromophenol blue) were heated for 5 min at 95°C, the proteins were separated by SDS-PAGE using 8%–12% resolving gels (SDS-PAGE running buffer: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) and transferred (semi-dry transfer) to PVDF membrane (0.45 µm pore size; Merck Millipore, Billerica, MA, USA). In between steps, membranes were washed with TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20), blocked either with 1% casein in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 214 mM NaCl or 5% BSA/TBST (Sigma-Aldrich) for 1 h at RT or overnight at 4°C and then incubated with primary antibody overnight at 4°C. After probing with HRP-conjugated secondary antibody for 1 h at RT, proteins of interest were detected using SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific). The following antibodies were used in this study: anti-caspase-8 p18 (1:1000, #sc-7890; Santa Cruz Biotechnology), anti-caspase-9 p35 (1:1000, #sc-8355; Santa Cruz Biotechnology), anti-PARP (1:1000, #sc-7150; Santa Cruz Biotechnology), anti-CHOP (1:2000, #2895; Cell Signaling Technology), anti-Bcl-2 (1:1000, #sc-7382; Santa Cruz Biotechnology), anti-Bcl-xs/l (1:1000, #sc-634; Santa Cruz Biotechnology), anti-Bax (1:1000, #sc-6236; Santa Cruz Biotechnology), anti-Bak (1:1000, #sc-832; Santa Cruz Biotechnology), anti-Akt (1:1000, #4691; Cell Signaling Technology), anti-phospho-Akt (1:1000, #4060; Cell Signaling Technology), anti-mTOR (1:1000, #2983; Cell Signaling Technology), anti-phospho-mTOR (1:1000, #2974; Cell Signaling Technology), anti-ERK1/2 (1:1000, #9102; Cell Signaling Technology), anti-phospho-ERK1/2 (1:1000, #9101; Cell Signaling Technology), anti-actin/HRP (1:2000, #sc-1615; Santa Cruz Biotechnology), anti-mouse/HRP (1:2000, #P0447; Dako, Glostrup, Denmark) and anti-rabbit/HRP (1:2000–3000, #P0048; Dako).

Long-term colony formation assay. The viable cells were counted using a hemacytometer (trypan blue exclusion method) and seeded in duplicate at a density of 5×10^2 cells/6 mL (21 cm^2). The dishes had been pre-coated with poly-L-lysine/PBS (0.001%; Sigma-Aldrich) and washed twice with PBS (with Ca^{2+} and Mg^{2+}). After 2 weeks, the colonies were fixed and stained with 1% crystal violet/ethanol (Sigma-Aldrich), documented with an Olympus Stylus SH-50 camera (Olympus America, USA), and counted manually using ImageJ 1.47 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The term plating efficiency (PE) indicates the percentage of seeded cells that grow to form colonies. The surviving fraction (SF) is calculated as the ratio between PE of treated and control cells multiplied by 100.

Analysis of drug interaction. The nature of the interactions between drugs studied was analyzed using the combination index method, derived from the median-effect principle of Chou and Talalay.⁽³³⁾ CI values indicate the following: <0.1, very strong synergism; 0.1–0.3, strong synergism; 0.3–0.7, synergism; 0.7–0.85, moderate synergism; 0.85–0.9, slight synergism; 0.9–1.1, nearly additive; 1.1–1.2, slight antagonism; 1.2–1.45, moderate antagonism; 1.45–3.3, antagonism; 3.3–10, strong antagonism; >10, very strong antagonism. The CI value was calculated using CompuSyn software (ComboSyn, Paramus NJ, USA). The CI was defined as follows: $\text{CI} = (\text{D})_1/(\text{Dx})_1 + (\text{D})_2/(\text{Dx})_2$ for mutually exclusive drugs. In the denominator, (Dx) is for D_1 “alone” that inhibits a system $x\%$, and $(\text{Dx})_2$ is for D_2 “alone” that inhibits

a system $x\%$. In the numerators, $(\text{D})_1 + (\text{D})_2$ “in combination” also inhibit $x\%$.

Statistical analysis. Data are presented as means \pm SD of results from at least three independent experiments. Comparisons between two groups: sorafenib treatment group versus combinatorial treatment group and betulinic acid treatment group versus combinatorial treatment group were analyzed by two-tailed Student’s *t*-test. Significance was assumed at $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$.

Results

Combination of sorafenib and betulinic acid inhibits growth of non-small cell lung cancer cell lines. To evaluate the effect of sorafenib, betulinic acid and their combination on the viability of NSCLC cells *in vitro*, we first examined the effects of this drug on the growth of NSCLC cells using the MTS assay. NSCLC cells were treated either with $1.3 \mu\text{g/mL}$ sorafenib or $3 \mu\text{g/mL}$ betulinic acid alone or in combination for 72 h. Sorafenib and betulinic acid alone decreased cell viability by an average of 88.3 ± 4.9 and $62.2 \pm 8.8\%$ in A549 cells, 89.2 ± 9.1 and $70.3 \pm 7.5\%$ in H358 cells, and 94.2 ± 1.4 and $77.7 \pm 5.1\%$ in A427 cells, respectively, but the combination treatment reduced cell viability more effectively to $52.2 \pm 3.9\%$ in A549 cells ($\text{CI} = 0.749$), $54.4 \pm 5.3\%$ in H358 cells ($\text{CI} = 0.802$) and $34.5 \pm 2.6\%$ in A427 cells ($\text{CI} = 0.497$) (Fig. 1a). We next investigated whether the combination of relatively low concentrations of sorafenib and betulinic acid could inhibit NSCLC cell

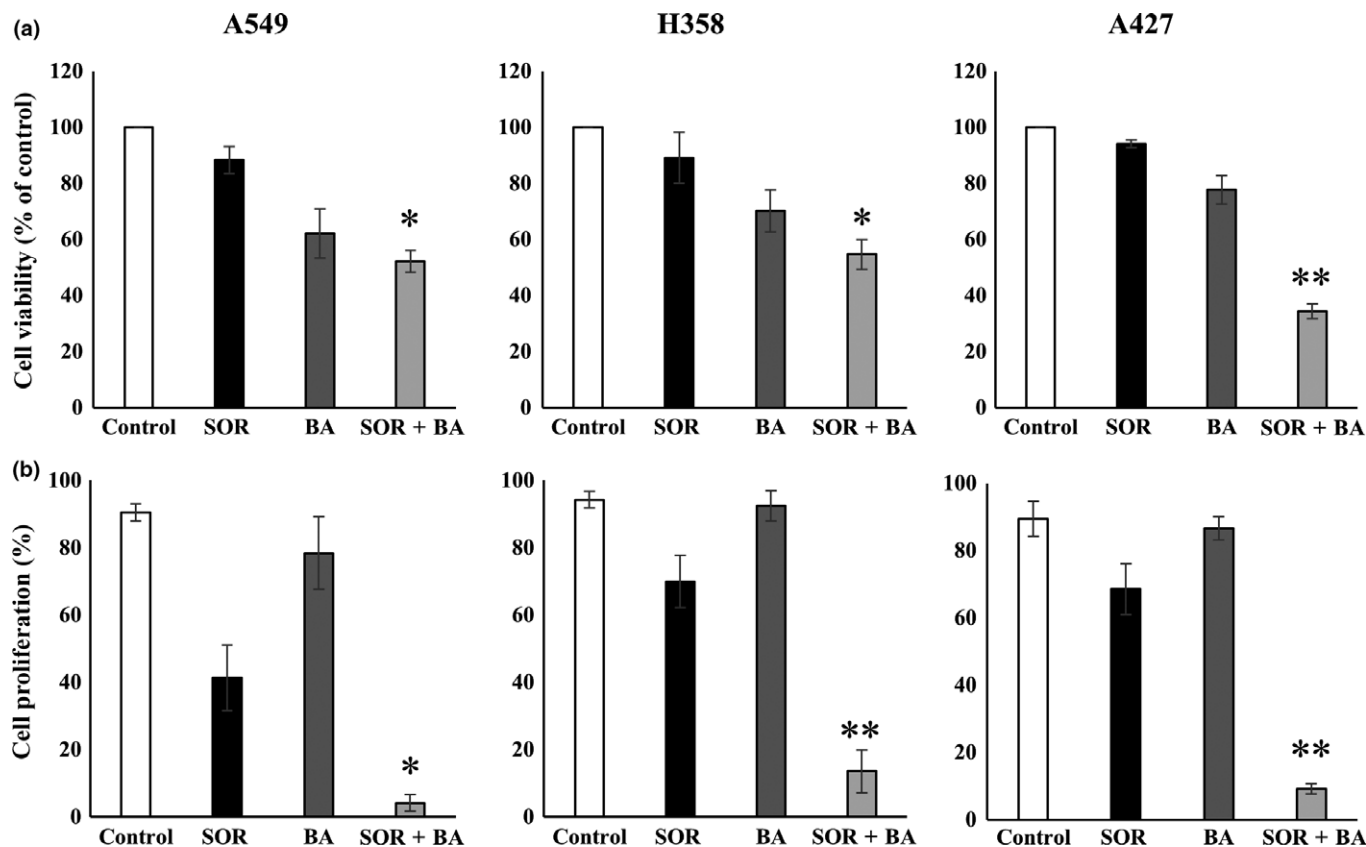


Fig. 1. Effects of combination treatment with sorafenib (SOR) and betulinic acid (BA) on the growth of non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines. (a) Cell viability of A549, H358 and A427 cells after exposure to $1.3 \mu\text{g/mL}$ sorafenib and $3 \mu\text{g/mL}$ betulinic acid alone and in combination. (b) Cell proliferation of A549, H358 and A427 cells after treatment with $1.3 \mu\text{g/mL}$ sorafenib and $3 \mu\text{g/mL}$ betulinic acid alone and in combination ($n = 4$). Data are presented as means \pm SD normalized to untreated control. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ compared with sorafenib treatment group and betulinic acid treatment group.

proliferation *in vitro* using a CellTrace Far Red Cell Proliferation Kit. As shown in Figure 1b, combination treatment significantly reduced the percentage of proliferating cells to $4.15 \pm 2.45\%$ in A549 cells (CI = 0.224), $13.59 \pm 6.63\%$ in H358 cells (CI = 0.169) and $9.21 \pm 1.44\%$ in A427 cells (CI = 0.249), as compared to either compound alone ($P < 0.05$).

Combined treatment of sorafenib and betulinic acid induce cell death in non-small cell lung cancer cell lines. We measured apoptosis-associated cell death using Annexin V-FITC/PI double staining and we detected apoptosis-related genes by western blotting to examine whether cell number reduction could be attributed to increased cell death. Combined treatment with sorafenib and betulinic acid induced apoptosis in $85.1 \pm 5.4\%$ of A549 cells, $54.5 \pm 8.1\%$ of H358 cells and $88.1 \pm 11.9\%$ of A427 cells (Fig. 2a). Treatment with a combination of these drugs led to a marked increase of apoptotic cells when compared to the extent of apoptosis following single drug treatments ($P < 0.01$) (Fig. 2a).

Apoptosis-related caspase-9 and caspase-8 gene activation and PARP cleavage was also measured in A549 cells (Fig. 2b). Combination of sorafenib and betulinic acid resulted in procaspase-9 and procaspase-8 cleavage, which led to the appearance of caspase-9 and caspase-8 after 24 h and cleaved PARP after 48 h.

The expression patterns of CHOP, Bcl-2, Bcl-x, Bax and Bak were determined by western blot analysis to explore the possible mechanism of the proapoptotic effect of combination treatment with sorafenib and betulinic acid. The results (Fig. 2c,d) showed that combined treatment with sorafenib and betulinic acid significantly increased the expression of CHOP and Bax proteins, and decreased the expression of anti-apoptotic genes, Bcl-2 and Bcl-x in live A549 cells when compared to the expression levels in cells treated with sorafenib and betulinic acid alone. In contrast, the expression of Bak was increased by betulinic acid alone.

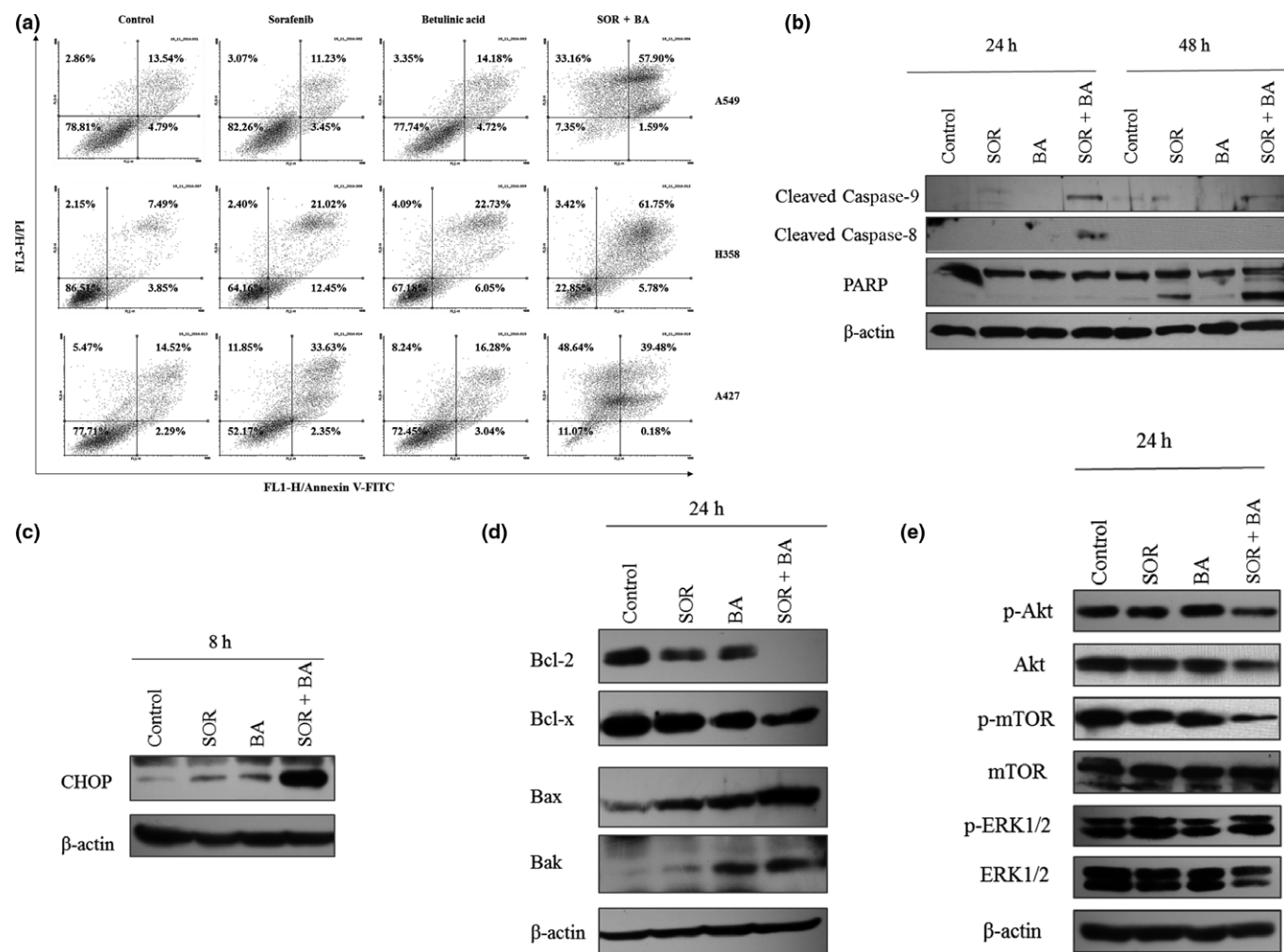


Fig. 2. Cytotoxicity effect of combination treatment with sorafenib (SOR) and betulinic acid (BA) on non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. (a) Representative Annexin V-FITC/PI-double staining histograms of A549, H358 and A427 cells after treatments with 1.3 µg/mL sorafenib and 3 µg/mL betulinic acid alone and in combination ($n = 4$). (b) Representative immunoblot of cleaved caspase-9 and caspase-8 activation and PARP fragmentation from A549 cells treated with 1.3 µg/mL sorafenib and 3 µg/mL betulinic acid alone and in combination ($n = 3$). Actin served as a loading control. (c) Representative immunoblot of CHOP expression from A549 cells treated with 1.3 µg/mL sorafenib and 3 µg/mL betulinic acid alone and in combination ($n = 3$). Actin served as a loading control. (d) Representative immunoblot of bcl-2 family expression from A549 cells treated with 1.3 µg/mL sorafenib and 3 µg/mL betulinic acid alone and in combination ($n = 3$). Actin served as a loading control. (e) Representative immunoblots of phospho-Akt (Ser473), Akt, phospho-mTOR (Ser2481), mTOR, phospho-ERK1/2, ERK1/2 expression from A549 cells after 24 h treatment with 1.3 µg/mL sorafenib and 3 µg/mL betulinic acid alone and in combination ($n = 3$). Actin served as a loading control.

The PI3K/AKT and MAPK signaling pathways are among the most frequently deregulated pathways in cancer, thereby suggesting a key role in carcinogenesis. Therefore, using western blotting, we evaluated the effect of sorafenib and betulinic acid alone and in combination on the phosphorylation of these proteins. The combination treatment inhibited expression or phosphorylation of Akt and mTOR, whereas MAPK was not affected (Fig. 2e).

Combined but not single sorafenib and betulinic acid treatment markedly reduces colony-forming ability of non-small cell lung cancer cells. Subsequently, we investigated whether combinatorial treatments with sorafenib and betulinic acid could impair NSCLC cell colony-forming ability more effectively than individual compounds. For this purpose, we performed a long-term colony formation assay. As shown in Figure 3, the clonogenic activity of A549, H358 and A427 cells after combinatorial but not single sorafenib and betulinic acid treatment significantly decreased ($P < 0.05$). This effect was much stronger in H358 cells (Fig. 3).

Combination treatment with sorafenib and betulinic acid is not toxic to human peripheral blood lymphocytes. Peripheral blood lymphocyte (PBL) cells were treated with 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sorafenib and 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ betulinic acid alone and in combination. Cell viability was measured after 72 h by the MTS assay. As shown in Figure 4a, combination treatment inhibited cell growth by an average of $67 \pm 3.1\%$, but the percentage of apoptotic cells measured by Annexin V-FITC/PI-double staining showed that combinational treatment with sorafenib and betulinic acid did not increase apoptosis in PBL cells.

Discussion

One of the goals of cancer chemotherapy is to explore and develop therapies that can selectively induce apoptosis in cancer cells. Recent studies have shown that different drug

combinations used in the treatment of tumor patients can increase the efficiency of antitumor response. In the present study, we hypothesized that the combination of sorafenib and betulinic acid could enhance the inhibitory effect in NSCLC cells.

Previous studies have shown that sorafenib alone inhibited the growth of NSCLC cells, and its combination with other drugs, such as gemcitabine or erlotinib, could increase the inhibitory effect in NSCLC cells or mouse models.^(34,35) The effectiveness of betulinic acid and other betulin derivatives in combination with chemotherapy or other target drugs is poorly explored. Only the synergistic effect of betulin with acyclovir and rimantadine was measured against herpes simplex and influenza viruses.^(36,37) To the best of our knowledge, the results of the present study have demonstrated for the first time that the combination of sorafenib and betulinic acid provides synergistic anti-proliferative and pro-apoptotic effects in NSCLC cells.

In this study, we found that the exposure of NSCLC cells to sorafenib and betulinic acid more effectively reduced cell viability and clonogenicity, and increased programmed cell death more than individual compounds at the same or even higher concentrations. We evaluated the effects of sorafenib and betulinic acid on the growth of NSCLC cells using two different assay systems, the MTS assay and the CellTrace Far Red Cell Proliferation Kit assay. We found that the potency of combination treatment in cell growth inhibition was similar for NSCLC cells, regardless of the assay system used. The inhibitory effect of sorafenib on tumor cell growth *in vitro* is mediated by the inhibition of RAF signaling pathways.⁽¹¹⁾ Takezawa *et al.*⁽¹²⁾ showed that sorafenib targeted B-RAF in NSCLC cells with wild-type KRAS and C-RAF in cells with mutant KRAS. The literature suggests that betulinic acid has the potential to specifically inhibit cancer cell growth through targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT signaling pathway.⁽²⁶⁾

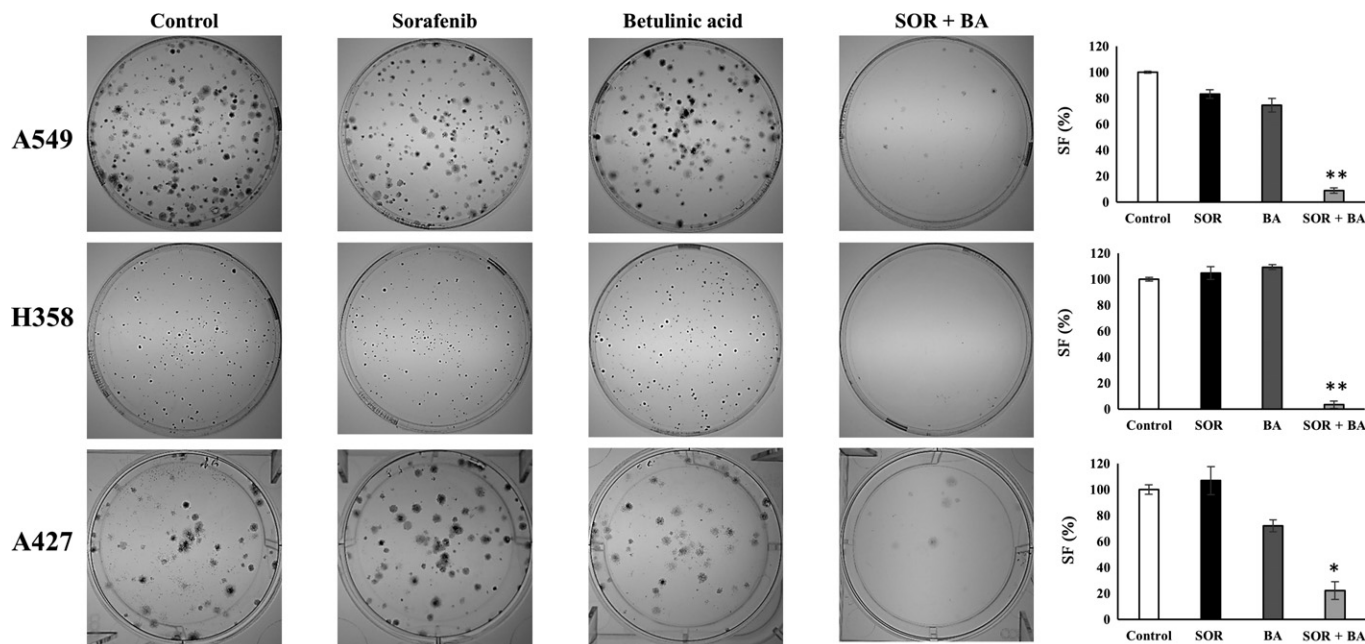


Fig. 3. Combinational treatment with sorafenib (SOR) and betulinic acid (BA) significantly reduces the colony-forming ability of A549, H358 and A427 cells as compared to either compound alone. Long-term colony formation assay. On the left: representative images of colonies formed by A549, H358 and A427 cells after treatment with 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sorafenib and 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ betulinic acid alone and in combination. On the right: the surviving fraction (SF) of A549, H358 and A427 cells after treatment with 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sorafenib and 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ betulinic acid alone and in combination ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with sorafenib treatment group and betulinic acid treatment group.

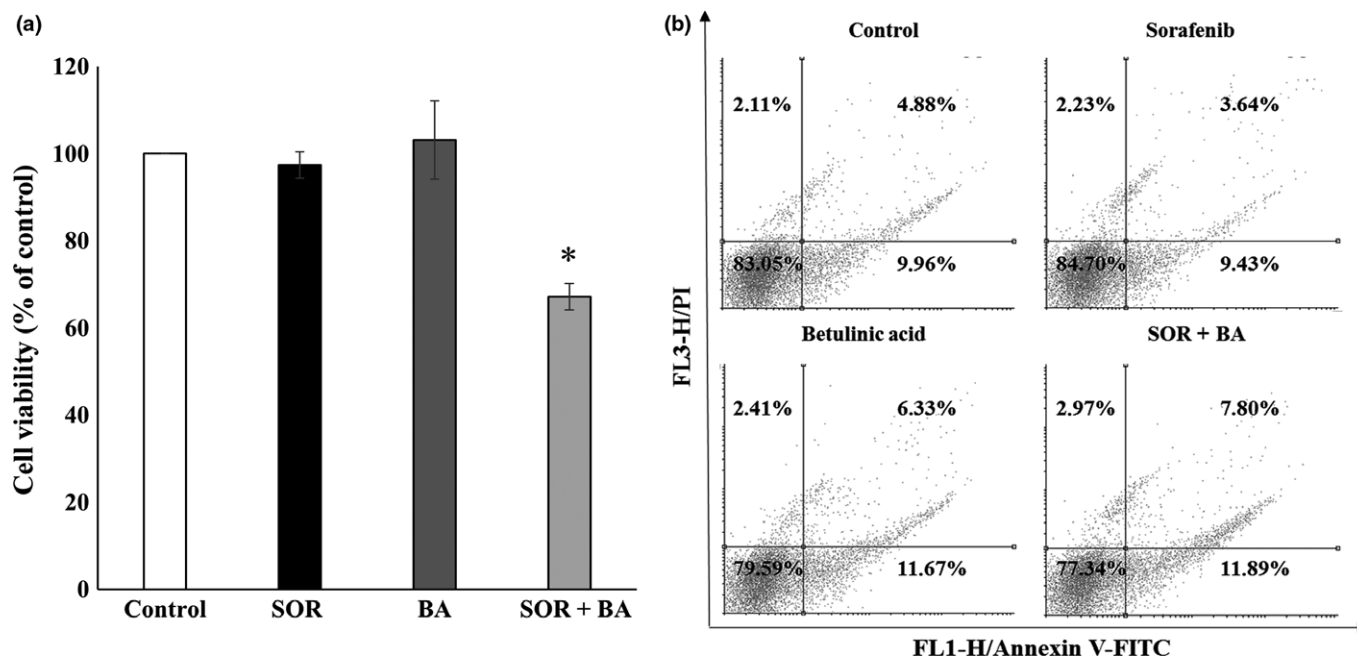


Fig. 4. Combination treatment with sorafenib (SOR) and betulinic acid (BA) is not toxic to human peripheral blood lymphocytes (PBL). (a) Cell viability of PBL cells after treatment with sorafenib 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and betulinic acid 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alone and in combination ($n = 4$). Data are presented as means \pm SD normalized to untreated control. (b) Representative Annexin V-FITC/PI-double staining histograms of PBL cells after treatments with 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sorafenib and 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ betulinic acid alone and in combination ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with sorafenib treatment group and betulinic acid treatment group.

In the present study, we also examined this intracellular signaling pathway in NSCLC cell lines following treatment with the combination of sorafenib and betulinic acid. Our results showed that sorafenib combined with betulinic acid inhibited the Akt signaling pathway in A549 cells. One of the consequences of Akt inhibition is the inhibition of mTOR. In turn, no changes were detected in MAPK activation. Thus, the combination of sorafenib with betulinic acid may target the PI3K/AKT pathway and this targeted approach may underlie the synergistic effects revealed here.

Apoptosis is associated with the inhibition of the Bcl-2 protein family and the activation of the caspase cascade.⁽³⁸⁾ The function of Bcl-2 protein, also known as pro-survival Bcl-2 protein, is to inhibit apoptosis and prolong cell survival. Overexpression of Bcl-2 protein is associated with a poor response to lung cancer treatment.⁽³⁹⁾ Bax, a pro-apoptotic protein of the Bcl-2 family, plays a key role in mediating the apoptotic response.⁽⁴⁰⁾ The ratio of Bcl-2 to Bax is commonly considered a determinant in the initiation of apoptosis.⁽⁴¹⁾ We observed that combination treatment with sorafenib and betulinic acid could significantly inhibit the downregulation of Bcl-2 and upregulation of Bax. Kennedy *et al.*⁽⁴²⁾ demonstrated that Akt inhibited apoptosis and cytochrome c release induced by several pro-apoptotic Bcl-2 family members. Suppression of Akt can directly activate Bad. Several papers have reported that suppression of PI3K/AKT signaling induces endoplasmic reticulum (ER) stress and that apoptosis involves Bax/Bak oligomerization.⁽⁴³⁾ In this study, we have shown that betulinic acid alone increased the expression of Bak. In addition, the Bcl-2 protein family is essential in mediating the crosstalk between ER and mitochondria to trigger apoptosis under chronic or irreversible ER stress.⁽⁴⁴⁾ We used CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP) as a marker of ER stress-mediated apoptosis, the expression of which is induced after combination treatment. CHOP is a

transcription factor involved in the ER stress response. The overexpression of CHOP induces apoptosis through downregulation of Bcl-2 and upregulation of the pro-apoptotic proteins like Bim, Bax and Puma.^(45,46) In our investigation, CHOP was rapidly induced by combination of sorafenib and betulinic acid. We found that combined treatment with sorafenib and betulinic acid induced both caspase 9 and caspase 8 in A549 cells, suggesting that both mitochondrial-dependent and mitochondrial-independent factors were responsible for the apoptotic potential. Subsequently, elevated levels of caspases led to the formation of cleaved product (85 kDa) of poly ADP-ribose polymerase (PARP). The function of PARP is a routine repair of DNA damage and this protein is commonly considered as a biochemical hallmark of apoptosis.⁽⁴⁷⁾ The annexin V/PE experiment was used to determine the apoptosis in A549, H358 and A427 NSCLC cells. The results showed that the apoptosis rate of the experimental group was significantly increased, as compared to the control group. The obtained results suggest that the possible mechanism of action of both compounds involves inhibition of Akt, which, in turn, induces ER stress, CHOP overexpression, decreasing Bcl2 expression and enhancing Bak expression. This is followed by the activation of caspases and cleavage of PARP in the nucleus.

We also performed a longer-term clonogenic survival assay and, once again, we found that the combination with sorafenib and betulinic acid inhibited the survival of NSCLC cells. It should be noted that combinatorial treatments with low concentration of sorafenib and betulinic acid have therapeutic potential for NSCLC treatment, because targeting a clonogenic/tumor initiating/stem cell-like subset of cancer cells is thought to be essential for a successful cancer therapy.⁽⁴⁸⁾

Clinically, phase III trials of sorafenib in previously treated advanced NSCLC have failed, because they did not significantly increase overall survival and generated unacceptable toxicities.⁽¹⁹⁾ We used a low concentration of this drug to

avoid this toxicity effect. In this study, we have shown that combination treatment with sorafenib and betulinic acid is not toxic for human PBL.

Recently, several publications have shown a synergistic effect of sorafenib in combination with different compounds against different types of tumors. Sorafenib in combination with histone deacetylase (HDAC) inhibitors exerted antiproliferative effect *in vitro* and *in vivo* on anaplastic thyroid carcinoma cell lines.⁽⁴⁹⁾ Sorafenib combined with gemcitabine or pemetrexed generated a synergistic effect against the A549 cell line.⁽⁵⁰⁾ The antitumor effect of sorafenib and pemetrexed combination was additionally enhanced by PDE5 inhibitors in NSCLC cells.⁽⁵¹⁾ Varinostat, when combined with gefitinib, strongly inhibited the growth of mutant KRAS lung cancer cells and hepatocarcinoma, but the combination of sorafenib and varinostat did not show such an effect.⁽⁵²⁾

In conclusion, the present study showed that sorafenib in combination with betulinic acid enhanced the inhibitory effect

on NSCLC cells. Betulinic acid strengthened the anti-proliferative action of sorafenib, promoting NSCLC cell apoptosis and allowing for the use of lower doses of sorafenib than currently applied. More importantly, the combination of sorafenib and betulinic acid was effective regardless of KRAS mutations. Therefore, it is worthwhile considering this combination treatment for NSCLC, and further evaluation in clinical trials is warranted.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Polish Academy of Sciences (no. 03/2016).

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- 1 Ettinger DS, Wood DE, Akerley W *et al.* Non-small cell lung cancer, Version 6.2015. *J Natl Compr Canc Netw* 2015; **13**: 515–24.
- 2 Kutkowska J, Porebska I, Rapak A. Non-small cell lung cancer – Mutations, targeted and combination therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2017; **71**: 431–45.
- 3 Vineis P, Alavanja M, Buffler P *et al.* Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 2004; **96**: 99–106.
- 4 Politi K, Herbst RS. Lung cancer in the era of precision medicine. *Clin Cancer Res* 2015; **21**: 2213–20.
- 5 Cheng L, Alexander RE, Maclennan GT *et al.* Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol* 2012; **25**: 347–69.
- 6 Sherwood J, Dearden S, Ratcliffe M, Walker J. Mutation status concordance between primary lesions and metastatic sites of advanced non-small-cell lung cancer and the impact of mutation testing methodologies: a literature review. *J Exp Clin Cancer Res* 2015; **34**: 92.
- 7 Krawczyk P, Ramlau R, Chorostowska-Wynimko J *et al.* The efficacy of EGFR gene mutation testing in various samples from non-small cell lung cancer patients: a multicenter retrospective study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; **141**: 61–8.
- 8 Bravaccini S, Tumedei MM, Ulivi P *et al.* ALK translocation detection in non-small cell lung cancer cytological samples obtained by TBNA or EBUS-TBNA. *Cytopathology* 2015; **27**: 103–7.
- 9 Karachaliou N, Mayo C, Costa C *et al.* KRAS mutations in lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2013; **14**: 205–14.
- 10 Miyake N, Chikumi H, Takata M, Nakamoto M, Igishi T, Shimizu E. Rapamycin induces p53-independent apoptosis through the mitochondrial pathway in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 2012; **28**: 848–54.
- 11 Zhang J, Gold KA, Kim E. Sorafenib in non-small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2012; **21**: 1417–26.
- 12 Takezawa K, Okamoto I, Yonesaka K *et al.* Sorafenib inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting B-RAF in KRAS wild-type cells and C-RAF in KRAS mutant cells. *Cancer Res* 2009; **69**: 6515–21.
- 13 Hong S, Tan M, Wang S, Luo S, Chen Y, Zhang L. Efficacy and safety of angiogenesis inhibitors in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; **141**: 909–21.
- 14 Dingemans AM, Mellema WW, Groen HJ *et al.* A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIB or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 743–51.
- 15 Wakelee HA, Lee JW, Hanna NH, Traynor AM, Carbone DP, Schiller JH. A double-blind randomized discontinuation phase-II study of sorafenib (BAY 43-9006) in previously treated non-small-cell lung cancer patients: eastern cooperative oncology group study E2501. *J Thorac Oncol* 2012; **7**: 1574–82.
- 16 Adjei AA, Molina JR, Mandrekar SJ *et al.* Phase I trial of sorafenib in combination with gefitinib in patients with refractory or recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 2684–91.
- 17 Lim SM, Cho BC, Kim SW *et al.* A multicenter phase II study of sorafenib in combination with erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer (KCSG-0806). *Lung Cancer* 2016; **93**: 1–8.
- 18 Scagliotti G, Novello S, von Pawel J *et al.* Phase III study of carboplatin and paclitaxel alone or with sorafenib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 1835–42.
- 19 Paz-Ares L, Hirsh V, Zhang L *et al.* MISSION Trial – A phase III, multi-center, placebo-controlled trial of sorafenib in patients with relapsed or refractory predominantly non-squamous NSCLC after 2 or 3 previous treatment regimens. *J Thorac Oncol* 2015; **10**: 1745–53.
- 20 Newman D, Cragg G. Natural products in medicinal chemistry. *Bioorg Med Chem* 2009; **17**: 2120.
- 21 Drag-Zalesinska M, Wysocka T, Borska S *et al.* The new esters derivatives of betulin and betulinic acid in epidermoid squamous carcinoma treatment – In vitro studies. *Biomed Pharmacother* 2015; **72**: 91–7.
- 22 Cichewicz RH, Kouzi SA. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med Res Rev* 2004; **24**: 90–114.
- 23 Li XD, Zhang YJ, Han JC. Betulin inhibits lung carcinoma proliferation through activation of AMPK signaling. *Tumour Biol* 2014; **35**: 11153–8.
- 24 Orchel A, Kulczycka A, Chodurek E *et al.* Influence of betulin and 28-O-propynoylbetulin on proliferation and apoptosis of human melanoma cells (G-361). *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2014; **68**: 191–7.
- 25 Yi J, Zhu R, Wu J *et al.* In vivo protective effect of betulinic acid on dexamethasone induced thymocyte apoptosis by reducing oxidative stress. *Pharmacol Rep* 2016; **68**: 95–100.
- 26 Majeed R, Hussain A, Sangwan PL *et al.* PI3K target based novel cyano derivative of betulinic acid induces its signalling inhibition by down-regulation of pGSK3beta and cyclin D1 and potentially checks cancer cell proliferation. *Mol Carcinog* 2016; **55**: 964–76.
- 27 Das J, Das S, Paul A, Samadder A, Khuda-Bukhsh AR. Strong anticancer potential of nano-triterpenoid from *Phytolacca decandra* against A549 adenocarcinoma via a Ca(2+) -dependent mitochondrial apoptotic pathway. *J Acupunct Meridian Stud* 2014; **7**: 140–50.
- 28 Liao CR, Kuo YH, Ho YL *et al.* Studies on cytotoxic constituents from the leaves of *Elaeagnus oldhamii* Maxim. in non-small cell lung cancer A549 cells. *Molecules* 2014; **19**: 9515–34.
- 29 Krol SK, Kielbus M, Rivero-Muller A, Stepulak A. Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 584189.
- 30 Yang SJ, Liu MC, Xiang HM, Zhao Q, Xue W, Yang S. Synthesis and in vitro antitumor evaluation of betulinic acid ester derivatives as novel apoptosis inducers. *Eur J Med Chem* 2015; **102**: 249–55.
- 31 Potze L, Di Franco S, Grandela C *et al.* Betulinic acid induces a novel cell death pathway that depends on cardiolipin modification. *Oncogene* 2016; **35**: 427–37.
- 32 Ali-Seyed M, Jantan I, Vijayaraghavan K, Bukhari SN. Betulinic acid: recent advances in chemical modifications, effective delivery, and molecular mechanisms of a promising anticancer therapy. *Chem Biol Drug Des* 2016; **87**: 517–36.
- 33 Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; **22**: 27–55.
- 34 Pasqualetti G, Ricciardi S, Mey V, Del Tacca M, Danesi R. Synergistic cytotoxicity, inhibition of signal transduction pathways and pharmacogenetics of sorafenib and gemcitabine in human NSCLC cell lines. *Lung Cancer* 2011; **74**: 197–205.
- 35 Giovannetti E, Labots M, Dekker H *et al.* Molecular mechanisms and modulation of key pathways underlying the synergistic interaction of sorafenib with erlotinib in non-small-cell-lung cancer (NSCLC) cells. *Curr Pharm Des* 2013; **19**: 927–39.

- 36 Gong Y, Raj KM, Luscombe CA *et al*. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Res* 2004; **64**: 127–30.
- 37 Savinova OV, Pavlova NI, Boreko EI. New betulin derivatives in combination with rimantadine for inhibition of influenza virus reproduction. *Antibiot Khimioter* 2009; **54**: 16–20.
- 38 Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**: 437–44.
- 39 Groeger AM, Esposito V, De Luca A *et al*. Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-xL in resected non-small-cell lung cancers. *Histopathology* 2004; **44**: 54–63.
- 40 Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 1339–50.
- 41 Cory S, Adams JM. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch. *Cancer Cell* 2005; **8**: 5–6.
- 42 Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 5800–10.
- 43 Lin ML, Chen SS, Huang RY *et al*. Suppression of PI3K/AKT signaling by synthetic bichalcone analog TSWU-CD4 induces ER stress- and Bax/Bak-mediated apoptosis of cancer cells. *Apoptosis* 2014; **19**: 1637–53.
- 44 Rodriguez D, Rojas-Rivera D, Hetz C. Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum: the BCL-2 protein family rheostat. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1813**: 564–74.
- 45 Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J Biochem* 2012; **151**: 217–9.
- 46 Lu HY, Chen XQ, Tang W, Wang QX, Zhang J. GRP78 silencing enhances hyperoxia-induced alveolar epithelial cell apoptosis via CHOP pathway. *Mol Med Rep* 2017; **16**: 1493–501.
- 47 Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol* 2008; **414**: 13–21.
- 48 Morrison R, Schleicher SM, Sun Y *et al*. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol* 2011; **2011**: 941876.
- 49 Park KC, Kim SM, Jeon JY *et al*. Synergistic activity of N-hydroxy-7-(2-naphthylthio) Heptanamide and sorafenib against cancer stem cells, anaplastic thyroid cancer. *Neoplasia* 2017; **19**: 145–53.
- 50 Li J, Wang S, Su ZF, Yuan Y. Synergistic effects of sorafenib in combination with gemcitabine or pemetrexed in lung cancer cell lines with K-ras mutations. *Contemp Oncol (Pozn)* 2016; **20**: 33–8.
- 51 Booth L, Roberts JL, Poklepovic A, Dent P. PDE5 inhibitors enhance the lethality of [pemetrexed + sorafenib]. *Oncotarget* 2017; **8**: 13464–75.
- 52 Jeannot V, Busser B, Vanwonderghem L *et al*. Synergistic activity of vorinostat combined with gefitinib but not with sorafenib in mutant KRAS human non-small cell lung cancers and hepatocarcinoma. *Oncotargets Ther* 2016; **9**: 6843–55.



Article

Sorafenib in Combination with Betulinic Acid Synergistically Induces Cell Cycle Arrest and Inhibits Clonogenic Activity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells

Justyna Kutkowska, Leon Strzadala and Andrzej Rapak *

Department of Experimental Oncology, Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy Polish Academy of Science, 53-114 Wrocław, Poland; justyna.kutkowska@iitd.pan.wroc.pl (J.K.); strzadala@iitd.pan.wroc.pl (L.S.)

* Correspondence: rapak@iitd.pan.wroc.pl; Tel.: +48-71-3371172

Received: 24 August 2018; Accepted: 16 October 2018; Published: 19 October 2018



Abstract: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most deadly cancers in the world due to late diagnosis and poor response to available treatments. It is important to identify treatment strategies that will increase the efficacy and reduce the toxicity of the currently used therapeutics. In this study, the PDAC cell lines AsPC-1, BxPC-3, and Capan-1 were treated with sorafenib and betulinic acid alone and in combination. We examined the effect of combined treatments on viability (MTS test), proliferation and apoptosis (annexin V staining), cell cycle arrest (PI staining), alterations in signaling pathways (Western blotting), and colony-forming ability. The combination of sorafenib with betulinic acid inhibited the viability and proliferation of PDAC cells without the induction of apoptosis. The antiproliferative effect, caused by G2 cell cycle arrest, was strongly associated with increased expression of p21 and decreased expression of c-Myc and cyclin D1, and was induced only by combined treatment. Additionally, decreased proliferation could also be associated with the inhibition of the P13K/Akt and MAPK signaling pathways. Importantly, combination treatment reduced the colony-forming ability of PDAC cells, as compared to both compounds alone. Collectively, we showed that combined treatment with low concentrations of sorafenib and betulinic acid had the capacity to inhibit proliferation and abolish clonogenic activity in PDAC cell lines.

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma; combination therapy; sorafenib; betulinic acid; clonogenic activity

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most deadly cancers of the digestive system worldwide [1]. Pancreatic cancer affects both men and women, and the overall five-year survival rate remains below 5% [2]. Chemotherapy is an important therapeutic method, but the sensitivity is low due to increasing drug resistance [3]. This situation is probably caused by the specific tumor microenvironment of pancreatic cancer.

Currently, gemcitabine is used as a standard therapy for advanced pancreatic cancer. However, gemcitabine alone is not very effective and is associated with drug resistance [4]. In view of that problem, developing new agents and innovative approaches are a continuing research effort to advance the treatment of this disease [5].

We have previously shown that combination treatment with sorafenib (SOR) and betulinic acid (BA) inhibits proliferation, induces cell death, and reduces colony-forming ability in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines with different KRAS mutations [6]. In pancreatic cancer, activating

KRAS mutations occur at a frequency of 90% [7]. Previous studies have shown that almost all therapies targeting KRAS mutations have failed [8]. Many efforts have been made in the field of PDAC therapies to develop drugs or combination of drugs targeting the components of the downstream effector pathways of KRAS signals, such as the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways [9].

Sorafenib (SOR) is an oral, multitargeted kinase inhibitor directed against the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) and -3 (VEGFR-3), platelet-derived growth factor receptor-b (PDGFRb), Fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3), and mast/stem cell growth factor receptor Kit (c-KIT) [10,11]. Sorafenib is approved for the treatment of renal cell carcinoma, hepatocellular carcinoma, and thyroid cancer [12,13]. The data suggest that sorafenib has a potential therapeutic benefit for PDAC treatment; however, the results of a combination therapy utilizing sorafenib with gemcitabine or sorafenib with erlotinib indicated that sorafenib was not able to enhance chemotherapeutic effect [14,15].

Several anticancer and anti-infectious drugs are derived from natural products [16]. Betulinic acid (BA) is a natural pentacyclic triterpene with a lupine structure isolated from the bark of the white birch (*Betula pubescens*) [17]. BA has been shown to induce apoptosis in a p53- and caspase-independent manner, mitochondrial membrane alteration, and DNA fragmentation [18]. Importantly, some reports showed that BA induced cell death by downregulating the expression of the P13K/Akt signaling pathway [19]. BA exhibits significant antitumor activities in various cancer cells, including pancreatic cancer [20].

In this study, we showed that combination treatment with SOR and BA also reduced the clonogenic potential of PDAC cells, suppressed proliferation via cell cycle arrest, and inhibited the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways, but it did not induce apoptosis. Combination therapies that act on different molecular targets in the cancer should increase the probability of cancer elimination and decrease the development of resistant cancer cells.

2. Results

2.1. The Combination of Sorafenib and Betulinic Acid Inhibits the Proliferation of PDAC Cell Lines, but Does Not Induce Apoptosis

Recently, we have shown that combination treatment with SOR and BA caused significant proliferation-inhibitory effects in NSCLC cell lines [6]. We first investigated the effects of SOR and BA on cell viability using the MTS assay to determine whether their combination can inhibit the proliferation of human PDAC cell lines with different mutational KRAS status (Table 1). Treatment of BxPC-3 cells with SOR and BA resulted in dose-dependent growth inhibition, but two other cell lines, AsPC-1 and Capan-1, were resistant to treatment with SOR and BA after 72 h. Next, PDAC cell lines were treated with sorafenib (AsPC-1 and Capan-1, 5 μ M; BxPC-3, 3 μ M) and betulinic acid (6 μ M) alone or in combination for 72 h. SOR and BA alone decreased cell viability by an average of $73.4 \pm 13.6\%$ and $83.5 \pm 10.8\%$ in AsPC-1 cells, $84.8 \pm 10.9\%$ and $72.3 \pm 13.2\%$ in BxPC-3 cells, $81.1 \pm 12.2\%$ and $101.8 \pm 8.7\%$ in Capan-1 cells, respectively, but combination treatment reduced cell viability more effectively to $59.8 \pm 3.7\%$ (CI = 0.829) in AsPC-1 cells, $42.2 \pm 10.1\%$ (CI = 0.633) in BxPC-3 cells, and $59.7 \pm 5.7\%$ (CI = 0.409) in Capan-1 cells (Figure 1A).

Table 1. Mutational status of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) critical genes [21,22].

PDAC Cell Line	Oncogenes	
	KRAS	BRAF
AsPC-1	G12D	wt
BxPC-3	wt	V487-P492>A
Capan-1	G12V	wt

wt—wild-type.

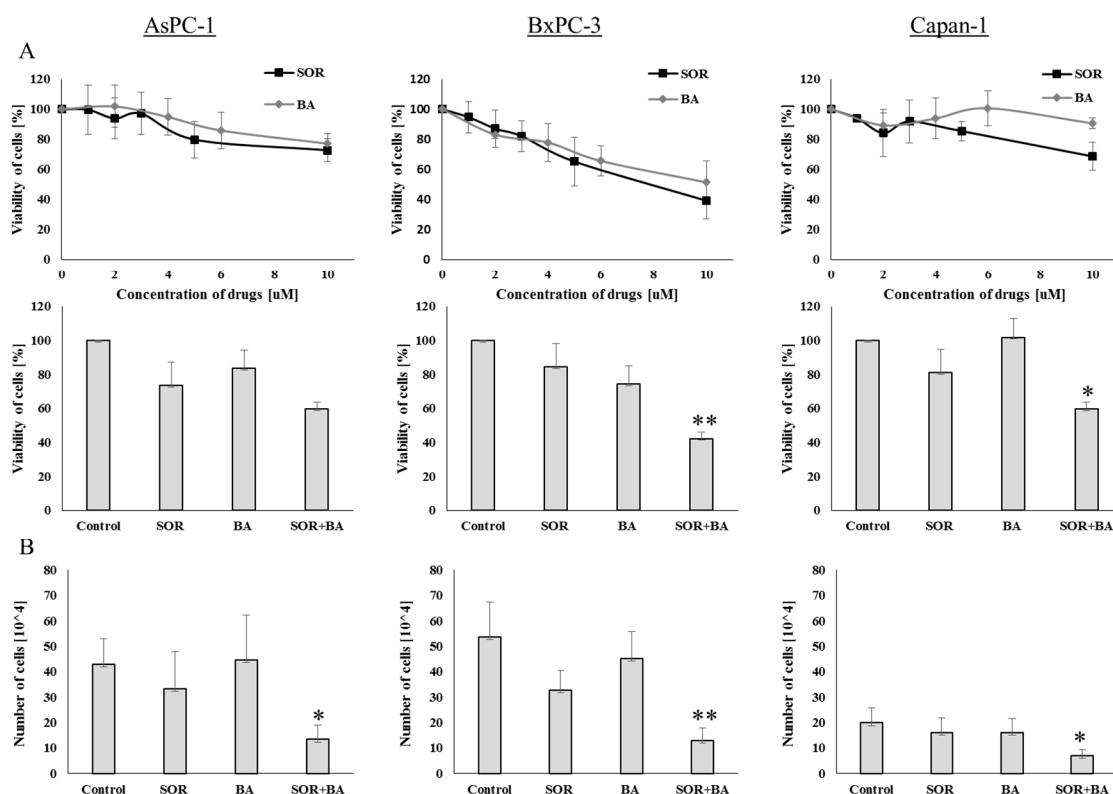


Figure 1. Effect of combination treatment with sorafenib (SOR) and betulinic acid (BA) on cell growth inhibition of PDAC cell lines. (A) Viability of AsPC-1, BxPC-3, and Capan-1 cells after exposure to sorafenib and betulinic acid at different drug concentrations (AsPC-1 and Capan-1: 5 μM, BxPC-3: 3 μM) and betulinic acid (6 μM) alone and in combination. (B) The number of AsPC-1, BxPC-3, and Capan-1 cells after treatments with sorafenib (AsPC-1 and Capan-1: 5 μM, BxPC-3: 3 μM) and betulinic acid (6 μM) alone and in combination ($n = 4$). Data are presented as means \pm SD normalized to the untreated control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the sorafenib treatment group and betulinic acid treatment group.

We subsequently investigated whether the combination of SOR and BA could inhibit PDAC cell proliferation using trypan blue staining. As shown in Figure 1B, combination treatment significantly reduced the number of cells from $45.5 \pm 12.7 \times 10^4$ to $13.3 \pm 5.5 \times 10^4$ (CI = 0.229) in AsPC-1 cells, from $46.8 \pm 8.2 \times 10^4$ to $13.02 \pm 4.9 \times 10^4$ (CI = 0.198) in BxPC-3 cells, and from $18.2 \pm 3.8 \times 10^4$ to $6.9 \pm 2.5 \times 10^4$ (CI = 0.272) in Capan-1 cells, as compared to either compound alone ($p < 0.05$).

Additionally, we used the annexin V-FIC/PI double staining and apoptosis-associated DNA fragmentation by staining cells with propidium iodide (PI) to evaluate whether the SOR and BA combination induced apoptosis in PDAC cells. As shown in Figure 2, combination treatment did not increase apoptosis in PDAC cell lines.

2.2. The Combination of Sorafenib and Betulinic Acid Induces G2 Cell Cycle Arrest in AsPC-1 Cells

The cell cycle distribution analysis was performed using flow cytometry to elucidate how the combination of SOR and BA inhibited cell proliferation. The results showed that the combination of SOR and BA significantly induced cell cycle arrest at G2 phase (Figure 3A). The percentage of G2 phase cells increased to 39% after treatment with the SOR and BA combination.

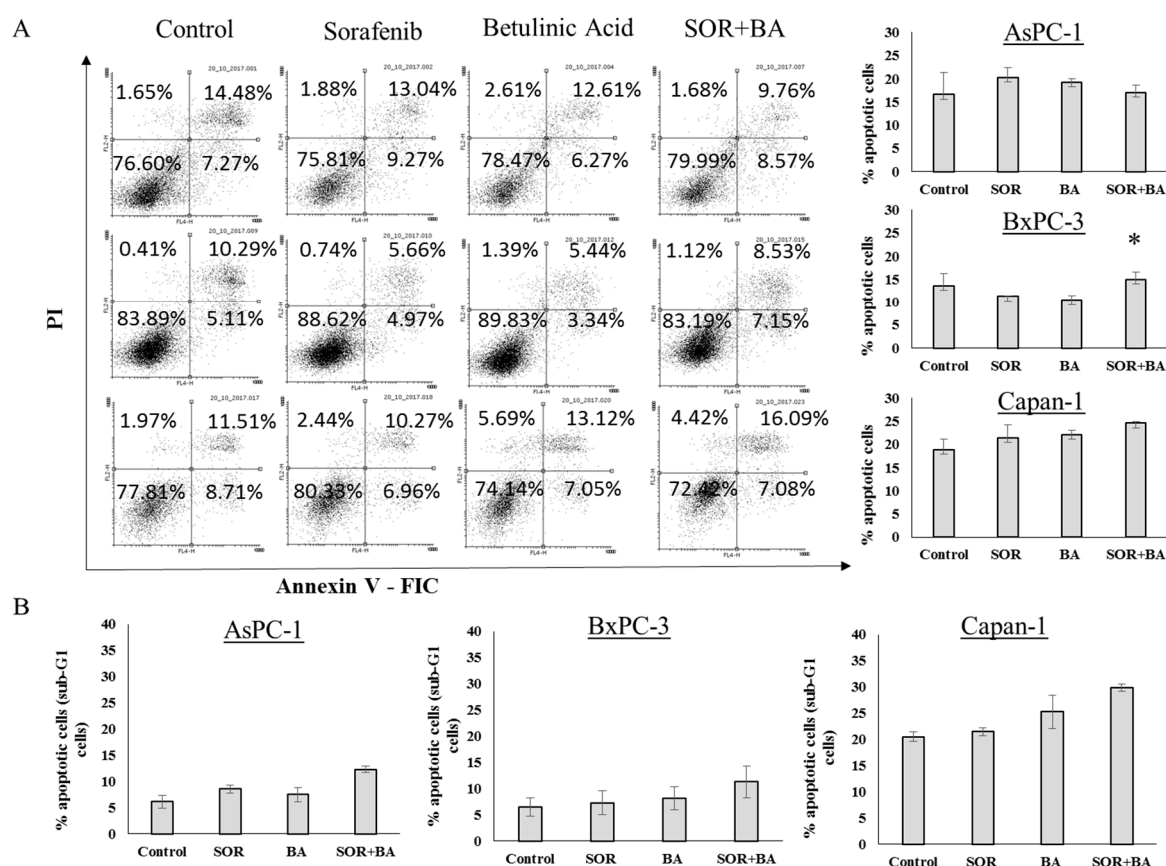


Figure 2. Cytotoxicity effect of combination treatment with SOR and BA on PDAC cells. (A) Representative FACS dot plots showing the effect of combination treatment with sorafenib (AsPC-1 and Capan-1: 5 μ M, BxPC-3: 3 μ M) and betulinic acid (6 μ M) on phosphatidylserine exposure and plasma membrane integrity after 72 h of incubation with pancreatic cancer cells, as determined by annexin V-FITC/PI staining. (B) Apoptosis-associated DNA fragmentation of AsPC-1, BxPC-3, and Capan-1 cells after treatments with sorafenib (AsPC-1 and Capan-1: 5 μ M, BxPC-3: 3 μ M) and betulinic acid (6 μ M) alone and in combination ($n = 3$). Data are presented as means \pm SD. * $p < 0.05$ compared with the sorafenib treatment group and betulinic acid treatment group.

The effect was further confirmed by the detection of key proteins that help regulate the cell cycle. Figure 3B shows that the level of p21 increased after treatment with SOR and BA alone and in combination for 24 h, while the levels of c-Myc and cyclin D1 decreased after combination treatment. However, the expression of cyclin B1 remained unchanged. These results suggest that cell cycle arrest in the G2 phase is a probable mechanism by which SOR + BA prevent PDAC cell proliferation. The results were similar in the other two cell lines.

2.3. Combination Treatment with Sorafenib and Betulinic Acid Inhibits the Expression of the PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways in the AsPC-1 and BxPC-3 Cell Lines

We investigated the effects of SOR and BA alone and in combination on the PI3K/Akt and/or MAPK signaling pathways in AsPC-1 and BxPC-3 cells, because the activation of these pathways is important for cell cycle progression in human pancreatic cancer cells [23,24]. Western blotting results showed (Figure 4) that combination treatment inhibited ERK1/2 phosphorylation after 24 and 72 h in BxPC-3 cells. In addition, combination treatment inhibited the expression and phosphorylation of Akt after 72 h in AsPC-1 cells and after 24 and 72 h in BxPC-3 cells.

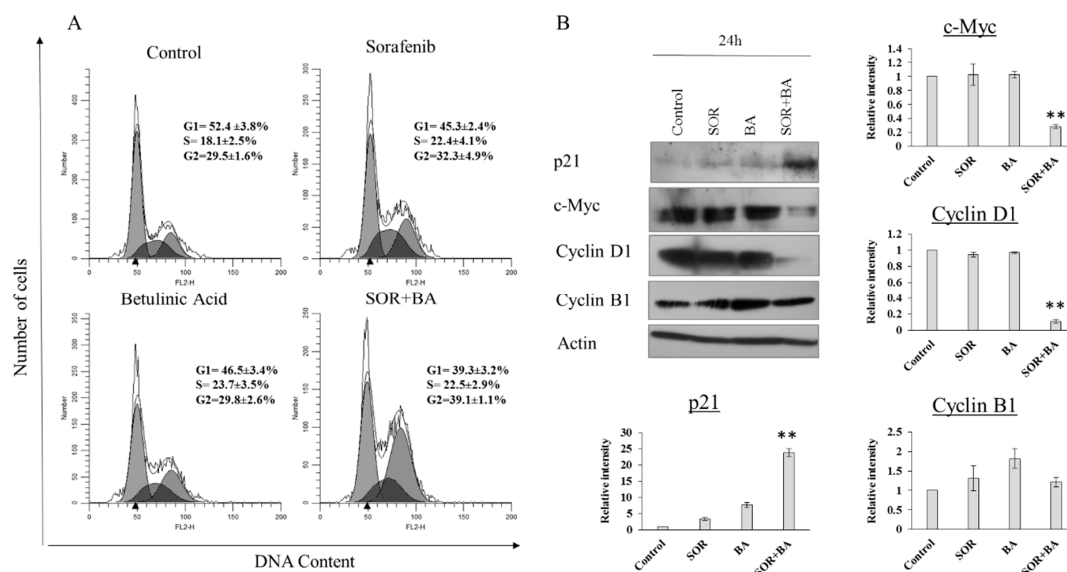


Figure 3. Effect of combination treatment with SOR and BA on cell cycle arrest in AsPC-1 cells. (A) Representative cell cycle analyzed by FACS of AsPC-1 cells after treatments with sorafenib (5 μM) and betulinic acid (6 μM) alone and in combination (n = 3). (B) Representative immunoblot of p21, c-Myc, cyclin D1, and cyclin B1 expression from AsPC-1 cells treated with sorafenib (5 μM) and betulinic acid (6 μM) alone and in combination (n = 3). Actin served as a loading control. Data are presented as means ± SD. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the sorafenib treatment group and betulinic acid treatment group. All experiments were repeated at least three times.

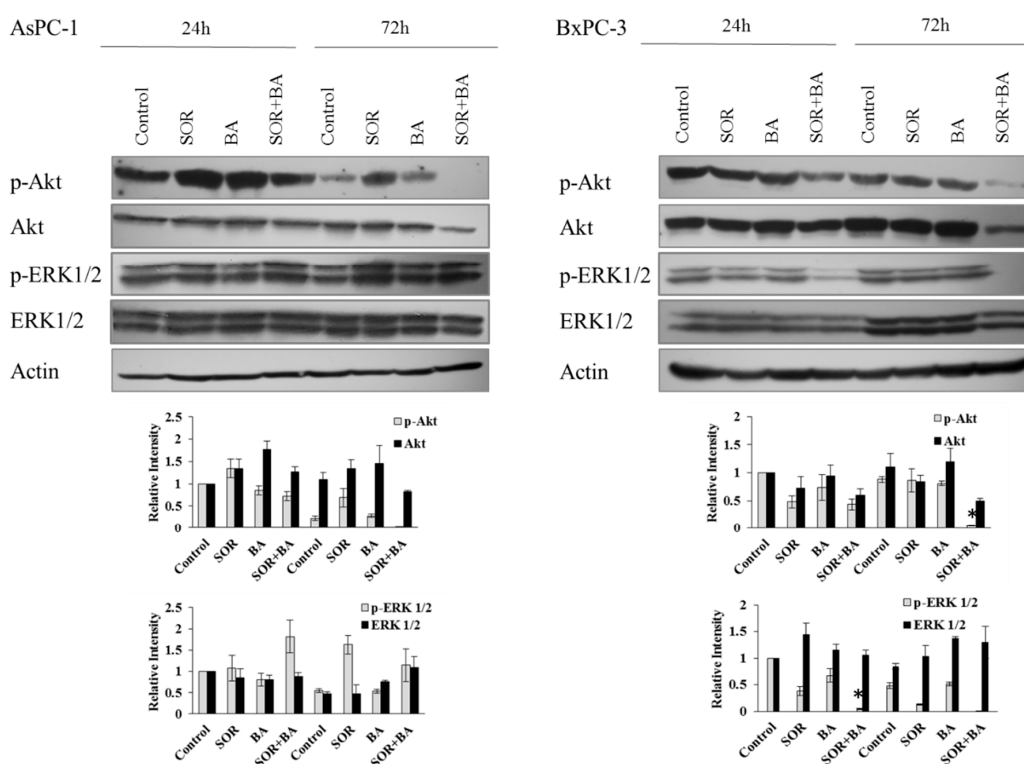


Figure 4. The effect of combination treatment with SOR and BA on protein expression of the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in human PDAC cell lines—AsPC-1 and BxPC-3. Representative immunoblot of phospho-Akt (Ser473), Akt, phospho-ERK1/2, and ERK1/2 expression from AsPC-1 and BxPC-3 cells treated with sorafenib (AsPC-1: 5 μM, BxPC-3: 3 μM) and betulinic acid (6 μM) alone and in combination (n = 3). Actin served as a loading control. Data are presented as means ± SD. * p < 0.05 compared with the sorafenib treatment group and betulinic acid treatment group.

2.4. The Combination of Sorafenib and Betulinic Acid Reduces the Colony-Forming Ability of PDAC Cell Lines

The long-term assay (clonogenic survival) was employed to determine the ability of combination treatment with SOR and BA to influence pancreatic cancer cell survival. PDAC cell lines were treated with sorafenib (AsPC-1 and Capan-1: 5 μ M, BxPC-3: 3 μ M) and betulinic acid (6 μ M) alone or in combination for 14 days, after which the number of colonies formed was counted (Figure 5). The SOR and BA combination significantly reduced the number of colonies (surviving fraction) compared to the control and single sorafenib and betulinic acid treatments for all cell lines. In addition to reducing the number of colonies, colony size appeared to be smaller in the SOR+BA treatment, suggesting that the combination also prevented the clonogenic expansion of existing tumor cells.

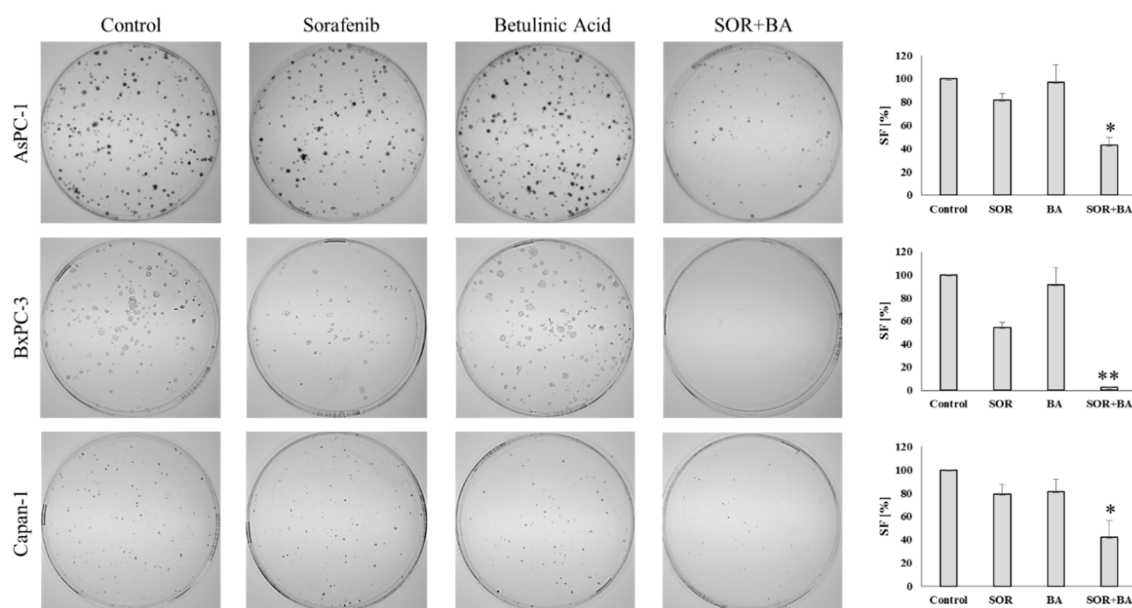


Figure 5. Effect of combination treatment with SOR and BA on the colony-forming ability of AsPC-1, BxPC-3, and Capan-1 cell lines. On the left: representative images of colonies formed by AsPC-1, BxPC-3, and Capan-1 cells after treatment with sorafenib (AsPC-1 and Capan-1: 5 μ M, BxPC-3: 3 μ M) and betulinic acid (6 μ M) alone and in combination. On the right: the surviving fraction (SF) of AsPC-1, BxPC-3, and Capan-1 cells after treatment with sorafenib (AsPC-1 and Capan-1: 5 μ M, BxPC-3: 3 μ M) and betulinic acid (6 μ M) alone and in combination ($n = 3$). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ compared with the sorafenib treatment group and betulinic acid treatment group.

3. Discussion

There are limited effective treatments for patients with pancreatic cancer. Gemcitabine combined with other adjuvants has been used to treat PDAC, but these approaches have had limited success and only extended life span by months with additional toxicity [25,26]. Several combination therapies with sorafenib, such as SOR with gemcitabine and erlotinib, have been evaluated in clinics; however, the outcomes were disappointing [14,15,27,28]. In addition, SOR has already been shown to exert no benefit for survival or other efficacy parameters in locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma [29]. Furthermore, Pandita et al. [20] showed that the combination of betulinic acid and gemcitabine inhibited cell proliferation, induced apoptosis, and downregulated the expression of PKM2 in PDAC cell lines. Moreover, betulinic acid was shown to have broad antitumor effects on PDAC cells in some other studies [30–32].

In this study, we determined that the natural product betulinic acid enhanced the effects of sorafenib in PDAC cell lines. Single treatment with SOR or BA shows dose-dependent growth inhibition only in the BxPC-3 cell line, whereas AsPC-1 and Capan-1 are highly resistant. Increased sensitivity of BxPC-3 cells can be caused by the presence of a mutation in BRAF, which is a possible

target of sorafenib. We found that SOR in combination with BA significantly inhibited the proliferation, promoted cell cycle arrest, and reduced the colony-forming ability of PDAC cells *in vitro*. Interestingly, this combination did not induce apoptosis.

Our data showed that combination treatment with SOR and BA increased the expression of p21 and simultaneously decreased the expression of c-Myc and cyclin D1. Some authors also reported that cyclin D1 was involved in G2 arrest, especially under high levels of oxidative stress [33]. Hitomi et al. suggested that the elevated cyclin D1 level in the G2 phase was a critical checkpoint for the progression of the cell cycle [34]. Suppression of cyclin D1 levels during the G2 phase promoted the inhibition of proliferation [35]. The c-MYC proto-oncogene is activated in many PDAC cases and plays a central role in many cellular processes, such as proliferation, differentiation, and apoptosis [36]. Moreover, c-Myc overexpression was reported to be associated with gemcitabine resistance [37]. According to some reports, c-Myc inhibition was not always associated with cell death [38]; *in vivo*, c-Myc correlated inversely with p21 expression. The level of c-Myc determines if p21 is induced or suppressed and whether cells undergo apoptosis or growth arrest [39]. Increased p21 expression is associated with cell cycle arrest, proliferation inhibition, and cell senescence [40]. Cell cycle regulators, including p21, p27, and cyclins, should be tightly controlled; p21 coordinates with p27, thereby modulating the expression of cyclin D1 and E2 [40]. Deregulation of cyclin D1 can lead to genetic instability *in vitro* and *in vivo* tumorigenesis [41]. Additionally, cyclin D1 overexpression is an independent prognostic factor for survival in patients with PDAC [42].

PI3K/Akt and MAPK/ERK are two of the early signaling pathways of cell cycle progression [28,43]. In this study, we demonstrated that combination treatment with SOR and BA inhibited pancreatic cancer cell cycle progression by inactivating PI3K/Akt and MAPK signaling. Recently published data have shown a synergic effect between sorafenib and HS-173 (a novel PI3K inhibitor). This treatment, by synergistically inhibiting the MAPK and PI3K/Akt pathways, induced G2/M arrest and increased apoptosis in pancreatic cancer cells [44]. However, while concurrent treatment with MEK and PI3K inhibitors has recently been investigated in mouse models of pancreatic cancer, only low antitumor activity was observed [45,46]. Moreover, a clinical trial of MEK and PI3K inhibitor combinations also suggested that normal tissue toxicity may limit this combination [40]. A clinical study of Akt and ERK inhibitor combinations needs to be conducted to determine whether targeting ERK rather than MEK will overcome these limitations.

Mechanisms of growth suppression by signaling inhibitors are usually characterized using short-term analyses, yet clinical application of such inhibitors involves persistent long-term treatment. In the present study, we performed a long-term clonogenic survival assay. Combination treatment with SOR and BA markedly decreased the colony-forming capability of PDAC cells. This treatment has been shown previously to be nontoxic for normal human peripheral blood lymphocytes [6]. It should be noted that tumor cell cloning efficiency is positively correlated with proliferation and self-renewal abilities, which may be associated with cell tumorigenesis [47]. Studying tumor clonogenic/stem-like cells contributes to the identification of molecular targets important in successful cancer therapy [48].

In summary, we have demonstrated for the first time that combination treatment with SOR and BA can more effectively attenuate cell proliferation, promote cell cycle arrest, and reduce colony-forming ability than a single treatment in human PDAC cell lines. Moreover, combined treatment with SOR and BA can inhibit phosphorylation of Akt and ERK1/2 more potently than their individual use, which may account for the synergistic antitumor effect of this combination treatment. This study may provide a novel indication for pancreatic cancer treatment.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture and Reagents

Pancreatic ductal adenocarcinoma lines with different types of mutations (AsPC-1, BxPC-3, and Capan-1) were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured in the recommended growth media with 10% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and antibiotic/antimycotic solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). All cell lines were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The cells were seeded at densities of 1 × 10⁴ cells/0.1 mL (0.32 cm²) (cell viability assay), 6 × 10⁴ cells/0.5 mL (1.9 cm²) (flow cytometry), 1 × 10⁵ cells/3 mL (9.5 cm²) (long-term colony formation assay, serial replating assay), and 1 × 10⁶ cells/4 mL (21 cm²) (Western blotting). The cells were treated with sorafenib (LC Laboratories), betulinic acid (Sigma-Aldrich Chemistry, St. Louis, MO, USA), and both at one day post-seeding. The cells were collected for the appropriate assay three days later.

4.2. Cell Viability Assay

Cell viability was assessed by the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's protocol. Each treatment within a single experiment was performed in triplicate. Absorbance at 490 nm was recorded using a Wallac 1420 VICTOR2 plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Data were normalized to the untreated control.

4.3. Cell Count

Floating and trypsinized cells were collected and suspended in fresh medium at room temperature. Twenty microliters of cell suspension was mixed with 20 µL of 0.4% Trypan blue solution (Bio-Rad, Carlsbad, CA, USA), and 20 µL of this mixture was used to count blue (dead) and white (alive) cells.

4.4. Analysis of Drug Interaction

The nature of the interactions between the drugs studied was analyzed with the help of combination-index (CI) methods, derived from the median-effect principle of Chou and Talalay [49]. CI values indicate the following: <0.1, very strong synergism; 0.1–0.3, strong synergism; 0.3–0.7, synergism; 0.7–0.85, moderate synergism; 0.85–0.9, slight synergism; 0.9–1.1, nearly additive; 1.1–1.2, slight antagonism; 1.2–1.45, moderate antagonism; 1.45–3.3, antagonism; 3.3–10, strong antagonism; >10, very strong antagonism. The CI value was calculated using CompuSyn software (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, USA). The CI was defined as follows: $CI = (D)1 / (Dx)1 + (D)2 / (Dx)2$ for mutually exclusive drugs. In the denominator, (Dx) is for D1 "alone" that inhibits a system x%, and (Dx)2 is for D2 "alone" that inhibits a system x%. In the numerators, (D)1 + (D)2 "in combination" also inhibit x%.

4.5. Annexin V Staining

Apoptosis was assessed by the Annexin V Apoptosis Detection Kit (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), according to the manufacturer's protocol. Briefly, the cells were stained with annexin V-FITC (8 µg/mL) and PI (5 µg/mL) for 15 min at RT in the dark. The cells were washed with cold PBS (with Ca²⁺ and Mg²⁺) containing 2.5% FBS between the steps. Data were acquired using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using Flowing Software 2.5.1 (Perttu Terho, Turku, Finland). Apoptosis was quantified as a percentage of both annexin V-positive and annexin V/PI-double-positive cells.

4.6. Cell Cycle and DNA Fragmentation Assay

The cells were fixed in 75% ethanol at 4 °C for 30 min, and then incubated with 50 ng/mL PI staining solution and 0.2 mg/mL RNase in the dark overnight at 4 °C. Data were acquired using a

FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using the ModFit LT 5.0 software (Verity Software House, Inc., Topsham, ME, USA).

4.7. Western Blotting

Whole cell lysates were prepared using cold RIPA buffer (150 mM NaCl (POCH), 50 mM Tris-HCl pH 8.0 (BioShop, Burlington, ON, Canada), 1% NP-40 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), 0.5% sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 1% SDS (BioShop, Burlington, ON, Canada)) supplemented with SigmaFAST Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cell lysates were then sonicated for 10 s at 100% power using a Sonopuls HD 2070 ultrasonic homogenizer (Bandelin, Berlin, Germany) and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4 °C to pellet cellular debris. Protein concentration was determined by the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's protocol. Absorbance at 570 nm was recorded using a Wallac 1420 VICTOR2 plate reader. Cell lysates with Laemmli sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol (BioShop, Burlington, ON, Canada), 5% 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2% SDS, 0.05% bromophenol blue (BioShop, Burlington, ON, Canada)) were heated for 5 min at 95 °C, the proteins were separated by SDS-PAGE using 8–12% resolving gels (SDS-PAGE running buffer: 25 mM Tris, 192 mM glycine (BioShop Burlington, ON, Canada), 0.1% SDS) and transferred (semidry transfer) to a PVDF membrane (0.45 µm pore size; Merck Millipore) (transfer buffer: 25 mM Tris, 192 mM glycine, and either 10% or 20% methanol (POCH)). In between the steps, membranes were washed with TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (BioShop, Burlington, ON, Canada)). Membranes were blocked either with 1% casein (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 214 mM NaCl, 1% casein from bovine milk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) or 5% BSA/TBST (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for an hour at RT or overnight at 4 °C and then incubated with primary antibody overnight at 4 °C. After probing with HRP-conjugated secondary antibody for 1 h at RT, proteins of interest were detected using SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The following antibodies were used in this study: anti-p21/HRP (1:1000, #sc-6246; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti-c-Myc (1:1000, #sc-788; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti-cyclin D1 (1:1000, #2978; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-cyclin B1 (1:2000, #4135; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-Akt (1:1000, #4691; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-phospho-Akt (1:1000, #4060; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-ERK1/2 (1:1000, #9102; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-phospho-ERK1/2 (1:1000, #9101; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-actin/HRP (1:2000, #sc-1615; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti-mouse/HRP (1:2000, #P0447; Dako, Glostrup, Denmark), and anti-rabbit/HRP (1:2000–3000, #P0048; Dako, Glostrup, Denmark).

4.8. Long-Term Colony-Formation Assay

Viable cells were counted using the trypan blue method and seeded in duplicate at a density of 5×10^2 cells/6 mL (21 cm²). The dishes had been precoated with poly-L-lysine/PBS (0.001%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and washed twice with PBS (with Ca²⁺ and Mg²⁺). After 2 weeks, the colonies were fixed and stained with 1% crystal violet/ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), documented with an Olympus Stylus SH-50 camera (Olympus, Tokyo, Japan), and counted manually using the ImageJ 1.47 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The term plating efficiency (PE) indicates the percentage of seeded cells that grow to form colonies. The surviving fraction (SF) is calculated as the ratio between the PEs of treated and control cells multiplied by 100.

4.9. Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SD of the results from at least three independent experiments. Comparisons between the two groups: sorafenib treatment group vs. combinatorial treatment group,

and betulinic acid treatment group vs. combinatorial treatment group, were analyzed by a two-tailed Student's *t*-test. The significance was assumed at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Author Contributions: Conceptualization, L.S. and A.R.; Data curation, J.K.; Formal analysis, J.K.; Methodology, J.K., and L.S.; Project administration, A.R.; Supervision, L.S. and A.R.; Writing—original draft, J.K.; Writing—review & editing, L.S. and A.R.

Funding: This work was supported by a grant from the Polish Academy of Sciences No. 03/2017 and by the Wrocław Centre of Biotechnology programme of The Leading National Research Centre (KNOW) for the years 2014–2018.

Acknowledgments: We thank Ewa Ziolo for her technical assistance in cell culture.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest with the content of this article.

Abbreviations

PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PBL	peripheral blood lymphocytes
RAS	retrovirus-associated DNA sequences
MAPK	mitogen-activated protein kinase pathway
PI3K	phosphoinositide-3-kinase
AKT	protein kinase B
RAF	v-raf 1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor receptor-2
PDGFR-b	platelet-derived growth factor receptor-b
FLT3	Fms-related tyrosine kinase 3
c-KIT	cell growth factor receptor Kit
c-MYC	transcription factor Myc
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
PI	propidium iodide
RT	room temperature
PBS	phosphate-buffered saline
FBS	fetal bovine serum

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hidalgo, M. Pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 1605–1617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wolfgang, C.L.; Herman, J.M.; Laheru, D.A.; Klein, A.P.; Erdek, M.A.; Fishman, E.K.; Hruban, R.H. Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J. Clin.* **2013**, *63*, 318–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kreutzer, J.N.; Ruzzene, M.; Guerra, B. Enhancing chemosensitivity to gemcitabine via rna interference targeting the catalytic subunits of protein kinase CK2 in human pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hsueh, C.T. Pancreatic cancer: Current standards, research updates and future directions. *J. Gastrointest. Oncol.* **2011**, *2*, 123–125. [[PubMed](#)]
6. Kutkowska, J.; Strzadala, L.; Rapak, A. Synergistic activity of sorafenib and betulinic acid against clonogenic activity of non-small cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 2265–2272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Caldas, C.; Kern, S.E. K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. *Int. J. Pancreatol.* **1995**, *18*, 1–6. [[PubMed](#)]
8. McCormick, F. Kras as a therapeutic target. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 1797–1801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Hayes, T.K.; Neel, N.F.; Hu, C.; Gautam, P.; Chenard, M.; Long, B.; Aziz, M.; Kassner, M.; Bryant, K.L.; Pierobon, M.; et al. Long-term ERK inhibition in kras-mutant pancreatic cancer is associated with Myc degradation and senescence-like growth suppression. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 75–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Wilhelm, S.M.; Carter, C.; Tang, L.; Wilkie, D.; McNabola, A.; Rong, H.; Chen, C.; Zhang, X.; Vincent, P.; McHugh, M.; et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7099–7109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Adnane, L.; Trail, P.A.; Taylor, I.; Wilhelm, S.M. Sorafenib (BAY 43-9006, nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol.* **2006**, *407*, 597–612. [[PubMed](#)]
12. Bruix, J.; Raoul, J.L.; Sherman, M.; Mazzaferro, V.; Bolondi, L.; Craxi, A.; Galle, P.R.; Santoro, A.; Beaugrand, M.; Sangiovanni, A.; et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: Subanalyses of a phase III trial. *J. Hepatol.* **2012**, *57*, 821–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Escudier, B.; Eisen, T.; Stadler, W.M.; Szczylik, C.; Oudard, S.; Staehler, M.; Negrier, S.; Chevreau, C.; Desai, A.A.; Rolland, F.; et al. Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase iii treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 3312–3318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Goncalves, A.; Gilabert, M.; Francois, E.; Dahan, L.; Perrier, H.; Lamy, R.; Re, D.; Largillier, R.; Gasmi, M.; Tchiknavorian, X.; et al. Baypan study: A double-blind phase III randomized trial comparing gemcitabine plus sorafenib and gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer. *Ann. Oncol.* **2012**, *23*, 2799–2805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Cardin, D.B.; Goff, L.; Li, C.I.; Shyr, Y.; Winkler, C.; DeVore, R.; Schlabach, L.; Holloway, M.; McClanahan, P.; Meyer, K.; et al. Phase II trial of sorafenib and erlotinib in advanced pancreatic cancer. *Cancer Med.* **2014**, *3*, 572–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Newman, D.; Cragg, G. Natural products in medicinal chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Rios, J.L.; Manez, S. New pharmacological opportunities for betulinic acid. *Planta Med.* **2018**, *84*, 8–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Goswami, P.; Paul, S.; Banerjee, R.; Kundu, R.; Mukherjee, A. Betulinic acid induces DNA damage and apoptosis in siha cells. *Mutat. Res.* **2018**, *828*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Xu, T.; Pang, Q.; Wang, Y.; Yan, X. Betulinic acid induces apoptosis by regulating PI3K/AKT signaling and mitochondrial pathways in human cervical cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40*, 1669–1678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Pandita, A.; Kumar, B.; Manvati, S.; Vaishnavi, S.; Singh, S.K.; Bamezai, R.N. Synergistic combination of gemcitabine and dietary molecule induces apoptosis in pancreatic cancer cells and down regulates PKM2 expression. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Deer, E.L.; Gonzalez-Hernandez, J.; Coursen, J.D.; Shea, J.E.; Ngatia, J.; Scaife, C.L.; Firpo, M.A.; Mulvihill, S.J. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* **2010**, *39*, 425–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kaufman, J.M.; Yamada, T.; Park, K.; Timmers, C.D.; Amann, J.M.; Carbone, D.P. A transcriptional signature identifies LKB1 functional status as a novel determinant of mek sensitivity in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 153–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. El-Rayes, B.F.; Ali, S.; Ali, I.F.; Philip, P.A.; Abbruzzese, J.; Sarkar, F.H. Potentiation of the effect of erlotinib by genistein in pancreatic cancer: The role of akt and nuclear factor-kappab. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 10553–10559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zhang, Y.; Yan, W.; Collins, M.A.; Bednar, F.; Rakshit, S.; Zetter, B.R.; Stanger, B.Z.; Chung, I.; Rhim, A.D.; di Magliano, M.P. Interleukin-6 is required for pancreatic cancer progression by promoting MAPK signaling activation and oxidative stress resistance. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 6359–6374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Heinemann, V.; Quietzsch, D.; Gieseler, F.; Gonnermann, M.; Schonekas, H.; Rost, A.; Neuhaus, H.; Haag, C.; Clemens, M.; Heinrich, B.; et al. Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 3946–3952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Berlin, J.D.; Catalano, P.; Thomas, J.P.; Kugler, J.W.; Haller, D.G.; Benson, A.B., 3rd. Phase iii study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern cooperative oncology group trial E2297. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 3270–3275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. El-Khoueiry, A.B.; Ramanathan, R.K.; Yang, D.Y.; Zhang, W.; Shibata, S.; Wright, J.J.; Gandara, D.; Lenz, H.J. A randomized phase ii of gemcitabine and sorafenib versus sorafenib alone in patients with metastatic pancreatic cancer. *Investig. New Drugs* **2012**, *30*, 1175–1183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Aparicio, J.; Garcia-Mora, C.; Martin, M.; Petriz, M.L.; Feliu, J.; Sanchez-Santos, M.E.; Ayuso, J.R.; Fuster, D.; Conill, C.; Maurel, J. A phase I, dose-finding study of sorafenib in combination with gemcitabine and radiation therapy in patients with unresectable pancreatic adenocarcinoma: A grupo espanol multidisciplinario en cancer digestivo (GEMCAD) study. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e82209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Saif, M.W. Pancreatic cancer: Sorafenib: No effect on efficacy of chemotherapy in pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 8–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Li, L.; Du, Y.; Kong, X.; Li, Z.; Jia, Z.; Cui, J.; Gao, J.; Wang, G.; Xie, K. Lamin b1 is a novel therapeutic target of betulinic acid in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4651–4661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Gao, Y.; Jia, Z.; Kong, X.; Li, Q.; Chang, D.Z.; Wei, D.; Le, X.; Suyun, H.; Huang, S.; Wang, L.; et al. Combining betulinic acid and mithramycin a effectively suppresses pancreatic cancer by inhibiting proliferation, invasion, and angiogenesis. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 5182–5193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Chintharlapalli, S.; Papineni, S.; Liu, S.; Jutooru, I.; Chadalapaka, G.; Cho, S.D.; Murthy, R.S.; You, Y.; Safe, S. 2-cyano-lup-1-en-3-oxo-20-oic acid, a cyano derivative of betulinic acid, activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colon and pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 2337–2346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Pyo, C.W.; Choi, J.H.; Oh, S.M.; Choi, S.Y. Oxidative stress-induced cyclin D1 depletion and its role in cell cycle processing. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 5316–5325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hitomi, M.; Yang, K.; Stacey, A.W.; Stacey, D.W. Phosphorylation of cyclin D1 regulated by ATM or ATR controls cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 5478–5493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Yang, K.; Hitomi, M.; Stacey, D.W. Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell Div.* **2006**, *1*, 32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Hessmann, E.; Schneider, G.; Ellenrieder, V.; Siveke, J.T. MYC in pancreatic cancer: Novel mechanistic insights and their translation into therapeutic strategies. *Oncogene* **2016**, *35*, 1609–1618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Seo, H.K.; Ahn, K.O.; Jung, N.R.; Shin, J.S.; Park, W.S.; Lee, K.H.; Lee, S.J.; Jeong, K.C. Antitumor activity of the c-Myc inhibitor KSI-3716 in gemcitabine-resistant bladder cancer. *Oncotarget* **2014**, *5*, 326–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Demeterco, C.; Itkin-Ansari, P.; Tyrberg, B.; Ford, L.P.; Jarvis, R.A.; Levine, F. c-Myc controls proliferation versus differentiation in human pancreatic endocrine cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 3475–3485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Hoffman, B.; Liebermann, D.A. Apoptotic signaling by c-Myc. *Oncogene* **2008**, *27*, 6462–6472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Parveen, A.; Akash, M.S.; Rehman, K.; Kyunn, W.W. Dual role of p21 in the progression of cancer and its treatment. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2016**, *26*, 49–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Nelsen, C.J.; Kuriyama, R.; Hirsch, B.; Negron, V.C.; Lingle, W.L.; Goggin, M.M.; Stanley, M.W.; Albrecht, J.H. Short term cyclin d1 overexpression induces centrosome amplification, mitotic spindle abnormalities, and aneuploidy. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 768–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bachmann, K.; Neumann, A.; Hinsch, A.; Nentwich, M.F.; El Gammal, A.T.; Vashist, Y.; Perez, D.; Bockhorn, M.; Izbicki, J.R.; Mann, O. Cyclin D1 is a strong prognostic factor for survival in pancreatic cancer: Analysis of CD G870A polymorphism, fish and immunohistochemistry. *J. Surg. Oncol.* **2015**, *111*, 316–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Garcia, Z.; Kumar, A.; Marques, M.; Cortes, I.; Carrera, A.C. Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO J.* **2006**, *25*, 655–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Yun, S.M.; Jung, K.H.; Lee, H.; Son, M.K.; Seo, J.H.; Yan, H.H.; Park, B.H.; Hong, S.; Hong, S.S. Synergistic anticancer activity of HS-173, a novel PI3K inhibitor in combination with sorafenib against pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* **2013**, *331*, 250–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Junttila, M.R.; Devasthali, V.; Cheng, J.H.; Castillo, J.; Metcalfe, C.; Clermont, A.C.; Otter, D.D.; Chan, E.; Bou-Reslan, H.; Cao, T.; et al. Modeling targeted inhibition of MEK and PI3 kinase in human pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 40–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Alagesan, B.; Contino, G.; Guimaraes, A.R.; Corcoran, R.B.; Deshpande, V.; Wojtkiewicz, G.R.; Hezel, A.F.; Wong, K.K.; Loda, M.; Weissleder, R.; et al. Combined MEK and PI3K inhibition in a mouse model of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 396–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Matsui, W.; Huff, C.A.; Wang, Q.; Malehorn, M.T.; Barber, J.; Tanhehco, Y.; Smith, B.D.; Civin, C.I.; Jones, R.J. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* **2004**, *103*, 2332–2336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Dou, J.; Li, Y.; Zhao, F.; Hu, W.; Wen, P.; Tang, Q.; Chu, L.; Wang, Y.; Cao, M.; Jiang, C.; et al. Identification of tumor stem-like cells in a mouse myeloma cell line. *Cell. Mol. Biol.* **2009**. [[CrossRef](#)]
49. Chou, T.C.; Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzym. Regul.* **1984**, *22*, 27–55. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).