

Mgr anal. med. Hanna Hołysz

**Próba identyfikacji markerów raka piersi w oparciu
o analizę polimorfizmów w genach *ABCB1*, *LEP* i *LEPR* oraz
ocena roli glikoproteiny-P w odpowiedzi komórek linii raka piersi
na działanie dokсорubicyny**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie biologia medyczna**

Promotor: dr hab. Błażej Rubiś, prof. UM

Miejsce realizacji: Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej



Wydział Lekarski I

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2019

Słowa kluczowe: rak piersi, polimorfizm, *ABCB1*, *LEP*, *LEPR*, doxorubicyna

Keywords: breast cancer, polymorphism, *ABCB1*, *LEP*, *LEPR*, doxorubicin

Badania realizowane w ramach:

- Uczelnianego projektu dla Młodych Naukowców

502-14-33184320-09342

- Badań statutowych Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej

502-01-03318432-08035

502-01-03318432-02496

Składam serdeczne podziękowania

Panu dr hab. Błażewi Rubisiowi prof. UM za stworzenie warunków umożliwiających realizację pracy doktorskiej i kierownictwo naukowe. Dziękuję za wieloletnią pomoc w realizacji trudnej drogi naukowej, cenne wskazówki oraz poświęcony czas.

Pani prof. dr hab. Marii Rybczyńskiej za umożliwienie rozpoczęcia pracy naukowej, wyznaczenie kierunku badań, cenne uwagi merytoryczne, miłą atmosferę oraz życzliwą pomoc.

Bardzo serdecznie dziękuję **Koleżankom z Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej** za nieocenione wsparcie, okazaną życzliwość, wielogodzinne dyskusje naukowe, pomoc przy wykonywaniu badań oraz za to, że są.

Szczególnie wdzięczna jestem **Pani dr Annie Paszel-Jaworskiej** za pomoc w ukierunkowaniu myśli i interpretacji wyników badań.

Mężowi Marcinowi dziękuję za miłość, akceptację, nieocenione wsparcie, zwłaszcza w chwilach słabości oraz bezgraniczną cierpliwość!

Dziękuję **Moim Rodzicom** za to, że zawsze mnie wspierali, motywowali do rozwoju i realizacji moich pasji. Dzięki Waszym wyrzeczeniom i ciężkiej pracy mogłam studiować i pracować naukowo. Dziękuję!

Pracę dedykuję mojemu Synkowi,

który jest moim największym szczęściem i najważniejszym osiągnięciem

Spis treści

1. WSTĘP.....	9
1.1. Epidemiologia nowotworów piersi.....	9
1.2. Czynniki ryzyka.....	12
1.2.1. Środowiskowe czynniki ryzyka raka piersi.....	12
1.2.2. Hormonalne czynniki ryzyka raka piersi.....	15
1.2.3. Leki jako czynnik ryzyka raka piersi.....	17
1.2.4. Anatomiczne predyspozycje do inicjacji raka piersi.....	18
1.2.5. Molekularne czynniki ryzyka raka piersi.....	18
1.2.6. Markery genowe.....	19
1.2.7. Markery prognostyczne.....	21
1.3. Nowe markery molekularne.....	23
1.4. Leptyna i receptor leptynowy.....	24
1.4.1. Budowa i funkcja leptyny.....	24
1.4.2. Gen <i>LEP</i>	26
1.4.3. Budowa i funkcja receptora leptynowego.....	27
1.4.4. Gen <i>LEPR</i>	29
1.4.5. Polimorfizmy genów <i>LEP</i> i <i>LEPR</i>	30
1.4.6. Udział polimorfizmów genów <i>LEP</i> i <i>LEPR</i> w patomechanizmie raka piersi.....	32
1.5. Białko ABCB1.....	33
1.5.1. Budowa i funkcja ABCB1.....	33
1.5.2. Gen <i>ABCB1</i>	36
1.5.3. Znaczenie polimorfizmów w genie <i>ABCB1</i> dla funkcjonowania transportera.....	36
1.5.4. Znaczenie polimorfizmów <i>ABCB1</i> w patogenezie i leczeniu raka piersi.....	38
2. CEL PRACY.....	41
3. ODCZYNNIKI, MATERIAŁY, METODY.....	42
3.1. Podłoża, bufony, enzymy, odczynniki.....	42
3.1.1. Podłoża:.....	42
3.1.2. Bufory:.....	42
3.1.3. Enzymy:.....	43
3.1.4. Odczynniki:.....	43
3.2. Stosowane metody.....	46
3.2.1. Izolacja DNA.....	46
3.2.2. Ocena jakościowa i ilościowa DNA.....	47
3.2.3. Oczyszczanie DNA.....	47
3.2.4. Analiza PCR-RFLP.....	48
3.2.5. PCR-ASA.....	53

3.2.6.	Analiza statystyczna	55
3.2.7.	Warunki hodowli <i>In vitro</i>	55
3.2.8.	Ocena przeżywalności komórek z wykorzystaniem testu MTT	56
3.2.9.	Ocena proliferacji w czasie rzeczywistym - xCELLigence RTCA	56
3.2.10.	Ocena proliferacji komórek w wybranych punktach czasowych	57
3.2.11.	Ocena morfologii komórek po ekspozycji na doksorubicynę	57
3.2.12.	Ocena poziomu białka ABCB1 w komórkach linii MCF7 i MDA-MB-231	58
3.2.13.	Ocena aktywności białka ABCB1	59
3.3.	Materiał badany.....	61
3.3.1.	Grupa kontrolna i badana	61
3.3.2.	Linie komórkowe	63
4.	WYNIKI.....	65
4.1.	Uzyskanie materiału do badań genetycznych i opracowanie bazy danych.....	65
4.2.	Charakterystyka grupy kontrolnej i badanej	65
4.3.	Analiza zależności pomiędzy częstością występowania polimorfizmów w grupie kobiet chorych na raka piersi oraz kobiet kontrolnych.	67
4.3.1.	Polimorfizm genów <i>LEP</i> i <i>LEPR</i>	67
4.3.2.	Polimorfizmy genu <i>ABCB1</i>	68
4.4.	Analiza zależności pomiędzy obecnością polimorfizmów a obecnością nadwagi i otyłości (wartość BMI powyżej 24.9).....	70
4.4.1.	Polimorfizmy genów <i>LEP</i> i <i>LEPR</i>	70
4.4.2.	Polimorfizmy genu <i>ABCB1</i>	72
4.5.	Zależność pomiędzy występowaniem polimorfizmów a obecnością receptorów ER, PgR i HER2.....	73
4.5.1.	Polimorfizmy genów <i>LEP</i> i <i>LEPR</i>	73
4.5.2.	Polimorfizmy genu <i>ABCB1</i>	75
4.6.	Ocena zależności pomiędzy obecnością polimorfizmów a wielkością guza pierwotnego (T), obecnością przerzutów do węzłów chłonnych (N) i histologicznym stopniem złośliwości (G) nowotworów.....	77
4.6.1.	Polimorfizmy genów <i>LEP</i> i <i>LEPR</i>	78
4.6.2.	Polimorfizmy genu <i>ABCB1</i>	80
4.7.	Analiza polimorfizmów genów <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> i <i>ABCB1</i> w modelu komórkowym.....	82
4.8.	Odpowiedź komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 na działanie doksorubicyny	83
4.8.1.	Ocena przeżywalności komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 za pomocą testu MTT... ..	83
4.8.2.	Ocena przeżywalności komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 za pomocą RTCA xCELLigence.....	84
4.8.3.	Ocena ilości oraz morfologii komórek linii MCF7 i MDA-MB-231	86
4.9.	Analiza zależności pomiędzy obecnością polimorfizmów genu <i>ABCB1</i> a aktywnością białka ABCB1 w komórkach raka piersi <i>in vitro</i>	88
4.10.	Analiza poziomu białka ABCB1 w komórkach linii MCF7 i MDA-MB-231	90

5. DYSKUSJA	91
6. WNIOSKI	109
7. STRESZCZENIE	111
8. ABSTRACT	113
9. PIŚMIENNICTWO.....	115
10.ZAŁĄCZNIKI	130
10.1. Opinia Komisji Bioetycznej Działającej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.....	130
10.2. Wzór formularza świadomej zgody pacjenta.....	134

Spis tabel

Tabela 1. Zachorowalność na nowotwory złośliwe w Polsce w latach 1980 – 2013 (2)	10
Tabela 2. Wykaz substratów białka ABCB1 stosowanych w leczeniu nowotworów. (118).....	35
Tabela 3 Sekwencje starterów, temperatura ich przyłączenia, długość produktów oraz procentowość żelu konieczna do analizy polimorfizmów genów <i>ABCB1</i> , <i>LEP</i> i <i>LEPR</i>	49
Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR.....	50
Tabela 5. Enzymy restrykcyjne oraz długość produktów trawienia enzymami wykorzystywanymi w analizie polimorfizmów genów <i>ABCB1</i> oraz <i>LEP</i> i <i>LEPR</i>	51
Tabela 6. Sekwencje starterów, temperatura ich przyłączenia, długość produktów oraz procentowość żelu konieczna do analizy polimorfizmu 2677G/A,T genu <i>ABCB1</i>	53
Tabela 7 . Skład mieszaniny reakcyjnej PCR-ASA.....	54
Tabela 8. Częstość występowania poszczególnych typów nowotworów piersi w grupie badanej.	62
Tabela 9. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej.....	65
Tabela 10. Charakterystyka kliniczno-histologiczna guzów piersi	66
Tabela 11. Częstość występowania polimorfizmów genów <i>LEP</i> i <i>LEPR</i> w grupie kobiet z rakiem piersi oraz kobiet zdrowych.....	67
Tabela 12. Częstość występowania polimorfizmów genu <i>ABCB1</i> w grupie kobiet z rakiem piersi oraz kobiet zdrowych.....	69
Tabela 13. Częstość występowania polimorfizmów genów <i>LEP</i> i <i>LEPR</i> w grupie kobiet z rakiem piersi oraz kobiet zdrowych z prawidłową masą ciała oraz nadwagą.....	71
Tabela 14. Częstość występowania polimorfizmów genu <i>ABCB1</i> w grupie kobiet z rakiem piersi oraz kobiet zdrowych z prawidłową masą ciała oraz nadwagą.	72
Tabela 15. Zależność pomiędzy polimorfizmami genów <i>LEP</i> i <i>LEPR</i> a ekspresją receptorów: estrogenowych (ER), progesteronowych (PgR) i naskórkowego czynnika wzrostu (HER2)	74
Tabela 16. Zależność pomiędzy polimorfizmami genu <i>ABCB1</i> a ekspresją receptorów: estrogenowych (ER), progesteronowych (PgR) i naskórkowego czynnika wzrostu (HER2).....	76
Tabela 17. Zależność pomiędzy obecnością poszczególnych alleli polimorfizmów genów <i>LEP</i> i <i>LEPR</i> a wielkością guza pierwotnego	78
Tabela 18. Zależność pomiędzy obecnością poszczególnych alleli polimorfizmów genów <i>LEP</i> i <i>LEPR</i> a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych	79
Tabela 19. Zależność pomiędzy obecnością poszczególnych alleli polimorfizmów genów <i>LEP</i> i <i>LEPR</i> a histopatologicznym stopniem złośliwości guza pierwotnego	79
Tabela 20. Zależność pomiędzy obecnością poszczególnych alleli polimorfizmów genu <i>ABCB1</i> a wielkością guza pierwotnego.....	80
Tabela 21. Zależność pomiędzy obecnością poszczególnych alleli polimorfizmów genu <i>ABCB1</i> a ilością zajętych węzłów chłonnych.....	81
Tabela 22. Zależność pomiędzy obecnością poszczególnych alleli polimorfizmów genu <i>ABCB1</i> a stopniem złośliwości histopatologicznej.....	81
Tabela 23. Rozkład alleli polimorfizmów genów <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> i <i>ABCB1</i> w komórkach raka piersi	82
Tabela 24. Wartości wskaźnika IC50 komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 poddanych działaniu doksorubicyny.....	83
Tabela 25. Poziom fluorescencji komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 będącej wynikiem kumulacji w komórce rodaminy 123.	89

Spis rycin

Rycina 1. Rozmieszczenie na świecie typów nowotworów występujących u mężczyzn	11
Rycina 2. Rozmieszczenie na świecie typów nowotworów występujących u kobiet	11
Rycina 3. Schemat aktywacji receptora leptynowego	28
Rycina 4. Schemat struktury ludzkiego chromosomu 1	29
Rycina 5. Schemat składania transkryptu kodującego różne izoforny receptora leptynowego.	30
Rycina 6. Lokalizacja polimorfizmów o znaczeniu klinicznych w genach <i>LEP</i> i <i>LEPR</i>	30
Rycina 7. Elektroforetyczny rozdział produktu reakcji PCR w gradiencie temperatury.	50
Rycina 8. Elektroforetyczny rozdział produktów trawienia amplikonów enzymem restrykcyjnym CfoI w 2% żelu agarozowym.....	51
Rycina 9. Elektroforetyczny rozdział produktów trawienia amplikonów enzymem restrykcyjnym MspI w 4% żelu agarozowym.....	52
Rycina 10. Elektroforetyczny rozdział produktów trawienia amplikonów enzymem restrykcyjnym HaeIII w 4% żelu agarozowym.	52
Rycina 11. Elektroforetyczny rozdział produktów trawienia amplikonów enzymem restrykcyjnym SauIII A1 w 3% żelu agarozowym.....	52
Rycina 12. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR-ASA.	54
Rycina 13 : Komórki nabłonkowe raka piersi linii MCF-7.....	63
Rycina 14 : Komórki nabłonkowe raka piersi linii MDA-MB-231.	64
Rycina 15. Morfologia komórek linii MCF7 poddanych działaniu doksorubicyny.....	87
Rycina 16. Morfologia komórek linii MDA-MB-231 poddanych działaniu doksorubicyny.....	88
Rycina 17. Analiza poziomu białka ABCB1 w komórkach linii MDA-MB-231 i MCF7.....	90

Spis wykresów

Wykres 1. Częstość występowania raka piersi w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej.....	12
Wykres 2. Wpływ doksorubicyny na indeks komórkowy komórek linii MCF7 traktowanych doksorubicyną w różnych stężeniach.	84
Wykres 3. Wpływ doksorubicyny na indeks komórkowy komórek linii MDA-MB-231 traktowanych doksorubicyną w różnych stężeniach.	85
Wykres 4. Wpływ doksorubicyny na liczebność komórek linii MCF7.	86
Wykres 5. Wpływ doksorubicyny na liczebność komórek linii MDA-MB-231.....	87

Wykaz stosowanych skrótów

- ABCB1 – białka posiadające kasetę wiążącą adenozylo-5'-trifosforan (ATP) (ang. *ATP-binding cassette subfamily B member 1*)
- AICR – Amerykański Instytut Badań nad Rakiem (ang. *American Institute for Cancer Research*)
- Alu – sekwencja DNA rozpoznawana przez enzymy bakteryjne AluI
- ATCC – Amerykańska kolekcja hodowli komórkowych (ang. *American Type Culture Collection*)
- ATM – kinaza białkowa serynowo-treoninowa (ang. *ataxia telangiectasia mutated*)
- ATP – adenozylo trójfosforan (ang. *adenosine triphosphate*)
- BAX – białko z rodziny białek Bcl-2 (ang. *Bcl-2-associated X protein*)
- BCL-2 – białko chłoniaka b komórkowego (ang. *B-cell lymphoma 2*)
- BRCA1, 2 – białko i genu supreserowy (ang. *Breast cancer type 1,2*)
- cDNA – komplementarne DNA (ang. *complementary DNA*)
- CHEK2 – kinaza białkowa odpowiedzialna za naprawę DNA (ang. *Checkpoint kinase 2*)
- CI – indeks komórkowy (ang. *cell index*).
- CM – rak śluzowy (ang. *carcinoma mucinosum*)
- CT – rak cewkowy (ang. *carcinoma tubular*)
- CYP – cytochrom
- DCIS – rak przewodowy in situ (ang. *ductal carcinoma in situ*)
- DES – Dietylstilbestrol
- DNA – kwas deoksyrybonukleionowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)
- DTP – trifosforany deoksyrybnukleotydów
- EDTA – wersenian disodowy (łac. *Acidum edeticum*)
- EGR1 – białko odpowiedzi wczesnego wzrostu (ang. *Early growth response factor-1*),
- ER – receptor estrogenowy (ang. *Estrogen receptor*)
- ERBB2 – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*)
- FBS – bydlęca surowica płodowa (ang. *fetal bovine serum*)
- FGF – Czynniki wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*)
- FSH – hormon folikulotropowy (ang. *follicle-stimulating hormone*)
- GCSF – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*)
- GnRH – hormon uwalniający gonadotropinę (ang. *gonadotropin-releasing hormone*)

HCV – Wirus zapalenia wątroby typ C (ang. *Hepatitis C Virus*)
HDL – lipoproteina o wysokiej gęstości (ang. *High Density Lipoprotein*)
HeLa – linia komórek raka szyjki macicy
HER2 – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*)
HIV – Ludzki wirus niedoboru odporności (ang. *human immunodeficiency virus*)
IARC – międzynarodowa agencja badań nad rakiem (ang. *International Agency for Research on Cancer*)
IDC – naciekający rak sutka (ang. *invasive ductal carcinoma*).
IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. *Insulin-like growth factor 1*)
IL-6, IL-8, IL-10 – Interleukina 6, 8, 10
ILC – naciekający rak zrazikowy (ang. *invasive lobular carcinoma*)
IRS-1 – substrat dla receptora insulinowego 1 (ang. *Insulin receptor substrate 1*)
JAK2 – kinaza janus 2 (ang. *Janus kinase 2*)
Ki-67 – marker proliferacji komórkowej
LDL – lipoproteina o niskiej gęstości (ang. *Low Density Lipoprotein*)
LEP – gen kodujący leptynę
LEPR – gen kodujący receptor leptynowy
LH – hormon luteinizujący (ang. *luteinizing hormone*)
LHR – receptor dla hormonu luteinizującego (ang. *luteinizing hormone receptor*)
MAPK – kinaza aktywowana mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinases*)
MCF7 – linia komórek raka piersi
MDA-MB-231 – linia komórek raka piersi
MDR1 – gen kodujący białko ABCB1/Mdr1/glikoproteinę P (ang. *multidrug resistance gene*)
MTT – bromek 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazolowy
nAChR – nikotynowy receptor acetylocholinergiczny (ang. *nicotinic acetylcholine receptor* –
NBD – domena łącząca nukleotydy (ang. *Nucleotide Binding domain*)
NF-IL6 – jądrowy czynnik dla interleukiny 6 (ang. *Nuclear factor for interleukin -6*),
NFkappaB – czynnik jądrowy kappa B (ang. *nuclear factor kappa B*)
NF-R2 – jądrowy czynnik dla erytrocytów 2(ang. *Nuclear erythroid 2-relatedr factor*),
NF-Y – jądrowy czynnik Y (ang. *Nuclear factor Y*)
Ob – zwierzęcy gen otyłości (ang. *obesity*)
p53 - czynnik transkrypcyjny o właściwościach supresora nowotworowego
PBS – Buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PCNA – jądrowy antygen dzielącej się komórki (ang. *Proliferating cell nuclear antygen*)

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazowa (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

PCR-ASA – reakcję PCR specyficzną względem allelu - (ang. *allele-specific amplification*)

Pgp – glikoproteina P (ang. *P-glycoprotein*)

PgR – receptor progesteronowy (ang. *Progesterone receptor*)

POCH – polskie odczynniki chemiczne

PTEN – homologi fosfatazy i tensyny (ang. *phosphatase and tensin homolog*)

pTNM – klasyfikacja oceniająca stopień zaawansowania nowotworu(ang. *Pathological tumor-node-metastasis*)

RFLP – analizę długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragments length polymorphism*).

Rh123 – Rodamina 123

RIPA – bufor do enzymatycznej lizy błon komórkowych (ang. *Radioimmunoprecipitation assay Buffer*)

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

RPMI1640 – pożywka wzrostowa dla komórek linii MCF7 i MDA-MB-231

RT – temperatura pokojowa (ang. *room temperature*)

SDS – siarczan dodecyłu sodu (ang. *Sodium dodecyl sulfate*)

SHP-2 – białko zawierające domenę SH2 (ang. *cytokine-inducible SH2-domain-containing protein*)

STAT3 – rodzina czynników transkrypcyjnych STAT (ang. *Signal transducer and activator of transcription 3*)

SXR/PXR – receptor dla steroidów i ksenobiotyków (ang. *Steroid and Xenobiotic receptor*)

TBST – PBS buforowany za pomocą Tris (ang. *Tris-buffered saline*)

TMD – domena przezbłonowa (ang. *Transmembrane domain*)

TNFalfa – czynnik martwicy nowotworu α (ang. *tumor necrosis factor α*)

UTR – sekwencje nie podlegające translacji (ang. *untranslated region*).

VEGF – Czynn timer wzrostu śródbłnka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*)

WCRF – Światowa Fundacja Badań nad Rakiem (ang. *World Cancer Research Found*)

WKT – wolne kwasy tłuszczowe

Wsp. - współczynnik

YB-1 – białko wiążące się z domeną Y (ang. *Y-box binding protein*)

1. Wstęp

1.1. Epidemiologia nowotworów piersi

Nowotwór to choroba cywilizacyjna XXI wieku jednakże już w starożytnym Rzymie znajdziemy wzmianki o diagnozowaniu oraz sposobach leczenia nowotworów m.in. raka piersi. Na podstawie obrazu klinicznego zaawansowanego raka piersi Hipokrates z Koss w 4 wieku p. n. e. jako pierwszy nazwał grupę chorób nowotworowych „*karkinos*”. (1) Niestety od czasów Hipokratesa częstość występowania nowotworów, w tym także raka piersi, znacząco wzrosła i stała się drugą, po chorobach serca, przyczyną zgonów zarówno w krajach rozwiniętych jak i rozwijających się. Według Międzynarodowej Agencji do Badań nad Rakiem IARC (ang. *International Agency for Research on Cancer*) w 2012 roku na świecie zdiagnozowano 14,1 miliona nowych przypadków raka z czego 8,2 miliona chorych zmarło. W skali świata rak piersi jest uznawany za najbardziej rozpowszechniony z nowotworów – aż 34% kobiet żyjących z nowotworem choruje właśnie na raka piersi. W Polsce statystyki są równie niepokojące. Częstość występowania nowotworów złośliwych w 2013 roku zwiększyła się od roku 1980 dwukrotnie a śmiertelność mężczyzn z powodu tego typu nowotworu prawie trzykrotnie (Tabela 1). (2)

Jednym z czynników determinującym rozwój poszczególnych typów nowotworów u mężczyzn jest rozmieszczenie geograficzne. Zaobserwowano, że u mężczyzn z rejonu Ameryki Północnej i Południowej najczęściej diagnozuje się raka prostaty a w Europie, w tym w Polsce, raka płuca (Rycina 1). (3) Podobnej zależności nie zauważono analizując częstość zachorowania na nowotwory wśród kobiet – najczęściej diagnozowanym nowotworem kobiet na całym świecie jest rak piersi. (Rycina 2). (4,5)

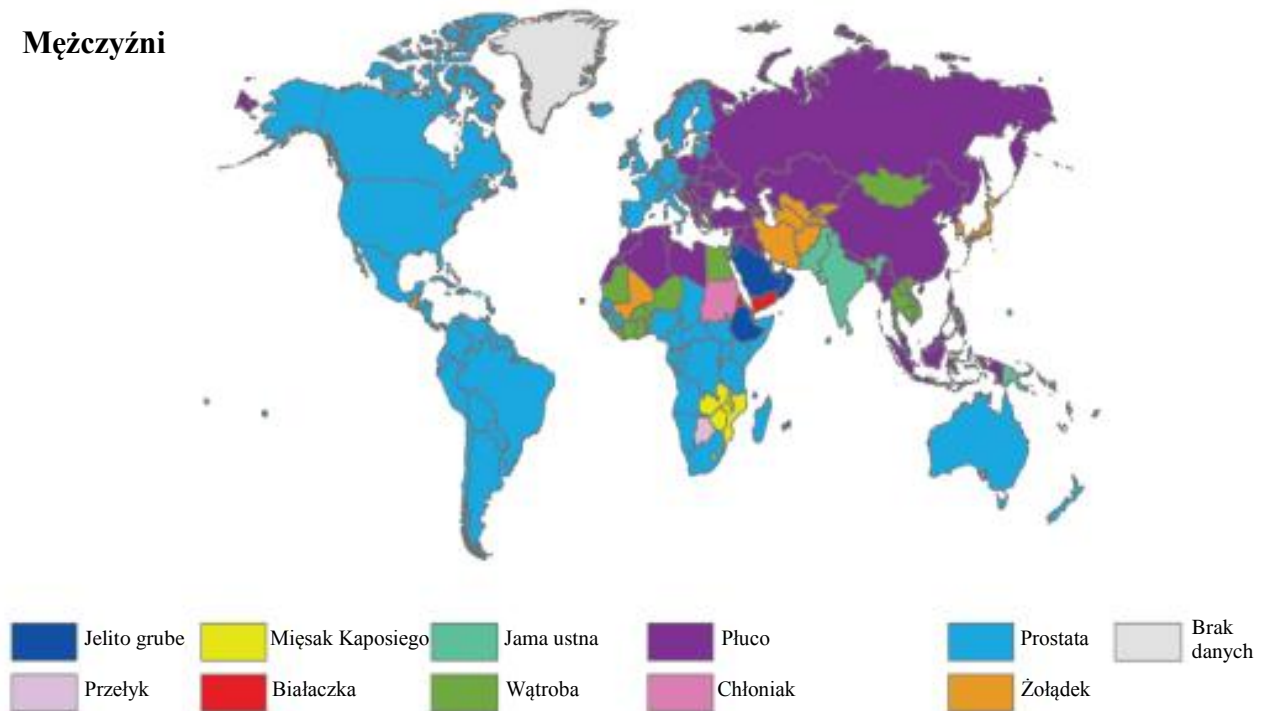
W Polsce także najczęściej diagnozowanym typem nowotworu jest rak sutka i dotyczy 23% kobiet chorych na nowotwór złośliwy. Liczba kobiet ze zdiagnozowanym rakiem sutka cały czas rośnie z 10903 przypadków w 1999 do 17142 w 2013 roku. Częstość zgonów z powodu tej choroby w Polsce także wzrasta; w 2013r złośliwy nowotwór piersi stanowił przyczynę zgonu 13,9% spośród wszystkich chorych na nowotwory kobiet. (6) Tak wysoka śmiertelność może wynikać ze zbyt późnego diagnozowania chorób nowotworowych oraz z wielu czynników zewnętrznych mogących stymulować szybki rozwój nowotworu. Dlatego też istotne jest opracowanie markerów diagnostycznych, które pomogą w szybkim, możliwie bezinwazyjnym, swoistym i czułym diagnozowaniu nowotworów, także raka piersi. Niestety nie jest to łatwe zadanie i wynika przede wszystkim z wieloczynnikowej etiologii procesu inicjacji raka piersi.

Tabela 1. Zachorowalność na nowotwory złośliwe w Polsce w latach 1980 – 2013 (2)

Rok	Mężczyźni		
	Liczba	Wsp. surowy	Wsp. stand.
1980	34074	196,6	185,5
1985	40882	225,3	211,1
1990	44903	241,7	219,7
1995	54613	290,8	252,4
2000	58985	314,1	252,0
2005	63984	346,6	253,6
2010	70024	375,5	251,0
2013	78236	419,8	262,5
Rok	Kobiety		
	Liczba	Wsp. surowy	Wsp. stand.
1980	30746	168,5	128,7
1985	35879	188,3	141,4
1990	38474	196,9	143,9
1995	48730	246,0	171,8
2000	55885	281,3	184,2
2005	61688	313,1	191,8
2010	70540	355,0	205,0
2013	78251	393,9	217,2
Rok	Obie płcie		
	Liczba	Wsp. surowy	Wsp. stand.
1980	64820	182,2	151,7
1985	76761	206,3	169,5
1990	83377	218,7	174,6
1995	103343	267,8	204,0
2000	114870	297,2	210,0
2005	125672	329,3	214,5
2010	140564	364,9	220,8
2013	156487	406,4	232,4

Wsp. surowy – ilość przypadków zdiagnozowanego raka piersi na 100 tys. osób w populacji polskiej; Wsp. stand. – ilość przypadków zdiagnozowanego raka piersi na 100 tys. kobiet w wieku okołomenopauzalnym.

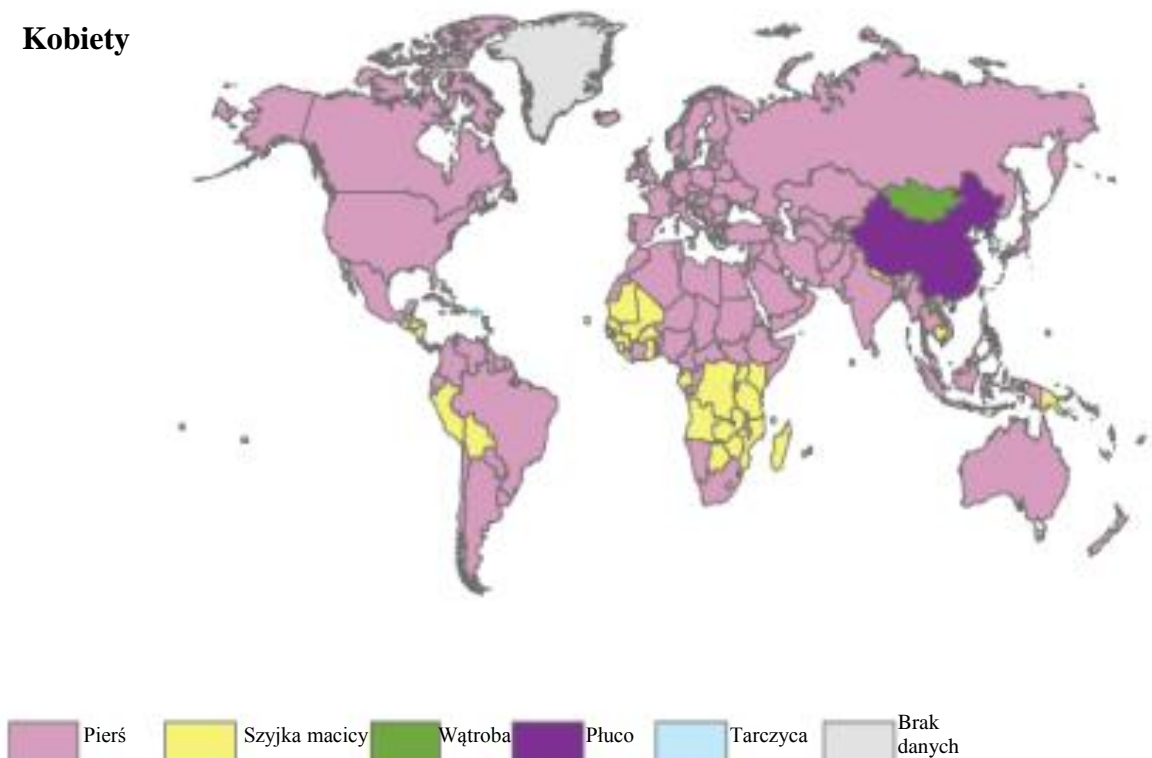
Mężczyźni



Rycina 1. Rozmieszczenie na świecie typów nowotworów występujących u mężczyzn

(4) Kolorami oznaczono poszczególne typy nowotworów oraz ich rozmieszczenie na mapie świata

Kobiety



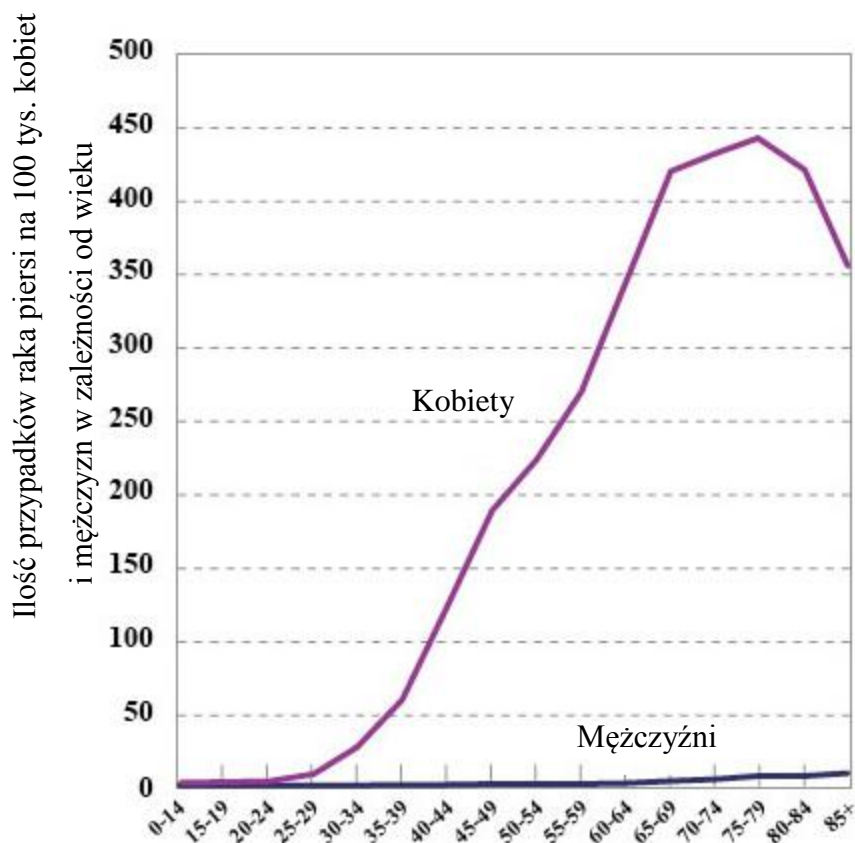
Rycina 2. Rozmieszczenie na świecie typów nowotworów występujących u kobiet

(4) Kolorami oznaczono poszczególne typy nowotworów oraz ich rozmieszczenie na mapie świata

1.2. Czynniki ryzyka

1.2.1. Środowiskowe czynniki ryzyka raka piersi

Nowotwór złośliwy piersi w niemal 99% przypadków dotyczy kobiet (7) w przedziale wiekowym 45-69 lat (8). Z kolei znaczący wzrost ryzyka zachorowania na raka piersi obserwuje się po 50 roku życia kobiet ze szczytem zachorowania w 70 roku życia (Wykres 1). (9)



Wykres 1. Częstość występowania raka piersi w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej.

Wykres przedstawia ilość przypadków raka piersi na 100 tysięcy mieszkańców wśród populacji kobiet i mężczyzn w różnych przedziałach wiekowych. (10)

Kolejną grupą czynników, które istotnie mogą wpływać na poziom ryzyka zachorowania na raka piersi jest styl życia. Nieprawidłowa dieta, palenie tytoniu, brak wysiłku fizycznego, spożywanie wysokoprocentowego alkoholu, promieniowanie jonizujące, przyjmowane leki czy praca zmianowa korelują ze zwiększoną częstością zachorowania na raka piersi.

Dieta

W 2018 roku Światowa Fundacja Badań nad Rakiem WCRF (ang. *World Cancer Research Found*) oraz Amerykański Instytut Badań nad Rakiem AICR (ang. *American Institute for Cancer Research*) opublikowali raport, w którym wskazują elementy diety istotnie zwiększające ryzyko zachorowania na raka. Spożywanie niektórych potraw może sprzyjać wprowadzaniu do organizmu i kumulacji substancji rakotwórczych oraz hormonów. Z drugiej strony nadmierna podaż niektórych pokarmów zwiększa prawdopodobieństwo otyłości i tym samym ryzyko raka piersi.

Uznaje się, że poziom wapnia w organizmie wynikający ze zwiększonego spożycia mleka i produktów mlecznych, nadmierne spożycie czerwonego i przetworzonego mięsa, zwiększona ilość tłuszczów, zwłaszcza nienasyconych oraz łatwo przyswajalnych cukrów w diecie, a w efekcie otyłość, są czynnikami niekorzystnymi. Natomiast zbilansowana, bogata w warzywa, owoce oraz błonnik dieta zarówno przed jak i po diagnozie raka piersi koreluje z niższym ryzykiem zgonu.

Z drugiej jednak strony, niedożywienie i brak w diecie niezbędnych substancji odżywczych także oddziałuje niekorzystnie na organizm. Niedobór kwasu foliowego w diecie może przyczyniać się do zaburzenia w metylacji DNA np. w rejonie promotora genu *p53* i w konsekwencji upośledzenia jego funkcji naprawczej. (11,12)

Alkohol

Alkohol, zwłaszcza wysokoprocentowy, bezpośrednio uszkadza DNA komórek a także wykazuje pośrednie działanie pro-kancerogenne stymulując generowanie wolnych rodników, ułatwia wnikanie mutagenów do komórek, a metabolit alkoholu etylowego – aldehyd octowy, uszkadza DNA i ogranicza naturalną zdolność komórki do jego naprawy. Ponadto etanol upośledza degradację estrogenów w wątrobie, powodując wzrost ich stężenia we krwi i w efekcie zwiększa możliwość niekontrolowanych podziałów komórek gruczołu piersiowego.

Dym tytoniowy

Dym tytoniowy zawiera około 60 substancji kancerogennych, z których najgroźniejsza jest nikotyna. Badania na zwierzętach oraz modelach komórkowych wskazują, że nikotyna stymuluje niekontrolowane podziały komórkowe. Proces ten może być efektem zwiększonej ekspresji acetylocholinergicznym receptorów nikotynowych (ang. *nicotinic acetylcholine receptor* - nAChR) zwłaszcza podjednostki alfa-9, w wyniku ekspozycji na nikotynę.

Ponadto nikotyna hamuje apoptozę, stymuluje angiogenezę i inwazyjność komórek nowotworowych, a także, podobnie jak alkohol, uszkadza DNA i hamuje jego naprawę. (13) Dlatego też u kobiet palących papierosy ryzyko raka piersi wzrasta o 12% a u byłych palaczek ryzyko, względem kobiet nigdy nie palących, jest wyższe o 9%. Prawdopodobieństwo zachorowania na raka piersi jest zależne od wieku w którym kobieta zaczęła palić, ilości wypalanych papierosów oraz długości palenia. (14–16) Ponadto, palenie tytoniu niekorzystnie wpływa na odpowiedź na terapię przeciwnowotworową. Nikotyna zmienia aktywność szeregu enzymów biorących udział w metabolizmie leków stosowanych w leczeniu raka piersi np. zwiększa aktywność cytochromów CYP1A1, 1A2, 1B1 i 2E1 a hamuje CYP2A6. U palaczy tytoniu wzrasta także poziom jednego z białek ostrej fazy alfa-1 kwaśnej glikoproteiny, która m.in. wiąże lipofilne leki jak np. docetaksel, imatinib, zmniejszając tym samym ich efekt terapeutyczny. (17)

Promieniowanie jonizujące

Na wzrost ryzyka zachorowania na raka piersi może mieć wpływ ekspozycja gruczołu piersiowego na promieniowanie jonizujące zwłaszcza przed 30 rokiem życia, czyli w okresie intensywnych podziałów komórek i rozwoju gruczołu piersiowego. (18) Ponadto, wykazano, że ekspozycja komórek organizmu na wysokie dawki (powyżej 20 Grey) promieniowania gamma indukuje degradację białka BRCA1 biorącego udział w naprawie DNA. Po 12 godzinach od ekspozycji na promieniowanie jonizujące nie wykryto białka BRCA1, natomiast poziom cykliny B, białek ATM, PCNA i Skip2 nie uległ zmianie. Białka te uczestniczą w fosforylacji białka BRCA1 oraz innych białek naprawczych DNA co hamuje ich funkcje (19,20) a utrata funkcji białka BRCA1 koreluje ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi oraz z szybszym rozwojem nowotworów, także raka piersi. (21,22)

Tryb pracy

Praca w systemie zmianowym doprowadza do zaburzenia rytmu dobowego a w efekcie do zmian hormonalnych i biochemicznych (poziom melatoniny, witaminy D₃) a tym samym zwiększa o 21% ryzyko raka piersi w odniesieniu do kobiet które zachowują prawidłowy rytm dobowy. (23,24)

1.2.2. Hormonalne czynniki ryzyka raka piersi

Estrogeny, to żeńskie hormony płciowe, które po połączeniu z receptorem estrogenowym, mają szerokie, pozytywne działanie na organizm kobiety. Poprzez wpływ na rozwój macicy, pochwy, sutka i zewnętrznych narządów płciowych stymulują rozwój drugorzędowych cech płciowych. Ponadto przyczyniają się do rozszerzenia naczyń krwionośnych, obniżenia stężenia cholesterolu całkowitego i zwiększenia stężenia lipidów o wysokiej gęstości (HDL) a jednocześnie do obniżenia stężenia lipidów frakcji LDL. Estrogeny wpływają również na poprawę elastyczności skóry i funkcjonowania błon śluzowych w wyniku zwiększenia nawodnienia tkanek; zapobiegają nadmiernej resorpcji kości i są w stanie modulować siłę skurczów mięśniowych poprzez stymulację białek miofibrylarnych. Obecność receptorów estrogenowych na powierzchni komórek gruczołu piersiowego umożliwia ich podział i tym samym rozwój całego gruczołu. Wykazano, że w komórkach nowotworowych także zachodzi ekspresja receptorów estrogenowych. (25)

Uważa się zatem, że wydłużona ekspozycja komórek gruczołu piersiowego na wysokie stężenie estrogenów, wzmacnia proliferację komórek i istotnie zwiększa ryzyko rozwoju raka piersi. Dlatego też, młody wiek wystąpienia pierwszej miesiączki, późna menopauza, późny wiek pierwszego porodu zakończonego urodzeniem żywego dziecka (26), krótki czas lub brak karmienia piersią są niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi (27). Natomiast długotrwałe karmienie piersią (co najmniej 18 miesięcy przy wszystkich ciążach), zwłaszcza przez kobiety z obciążonym wywiadem rodzinnym i mutacją w genie *BRCA1* zmniejsza prawdopodobieństwo powstania raka piersi o około 50% tj. z 50-80% do 25-40%. (28)

Zaburzenie poziomu hormonów płciowych może być także efektem otyłości, zwłaszcza otyłości brzusznej w wieku pomenopauzalnym. Ryzyko wystąpienia raka piersi u kobiet otyłych, z ekspresją receptorów estrogenowych i progesteronowych wzrasta aż o 58% względem kobiet o prawidłowej masie ciała. (29) Według badań, prawidłowa i zbilansowana dieta oraz wysiłek fizyczny mogą zmniejszyć ilość nowych przypadków nowotworów na świecie o 3-4 miliony nowych przypadków w skali roku.

Zależność pomiędzy otyłością a rakiem piersi może także wynikać z hormonalnej aktywności tkanki tłuszczowej, która obecnie uważana jest za największy narząd wydzielania dokrewnego. Tkanka tłuszczowa produkuje m.in. insulinę, insulinopodobny czynnik wzrostu, czynnik jądrowy κ B (NF- κ B), czynnik martwicy nowotworów alfa, interleukinę 6, adiponektynę, leptynę, inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1, angiotensynę. (30) Ponadto tkanka tłuszczowa produkuje estrogeny i tym samym zwiększa rozrost estrogenozależnego

raka sutka. (31) Dodatkowo u kobiet otyłych częściej obserwuje się raka piersi o większym stopniu złośliwości oraz na wyższym stopniu zaawansowania. (32) Częściej także w tej populacji kobiet występują przerzuty do węzłów chłonnych i narządów odległych. Ponadto, otyłość jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym jeśli chodzi o odpowiedź na leczenie (33), co w konsekwencji skutkuje większym ryzykiem zgonu (o 30%) względem kobiet nieotyłych (34).

U osób otyłych, w wyniku dużego spożycia węglowodanów dochodzi do wzrostu stężenia insuliny, hormonu biorącego udział w regulacji stężenia glukozy we krwi, a także odpowiedzialnego za magazynowanie tkanki tłuszczowej. W wyniku hiperinsulinemii dochodzi do wzrostu ilości tkanki tłuszczowej i otyłości. Tkanka tłuszczowa natomiast przyczynia się do powstania insulinooporności poprzez produkcję hormonów działających przeciwstawnie do insuliny lub hamujących efekty jej działania. Ponadto u osób otyłych dochodzi do wykorzystywania jako źródła energii, zamiast glukozy, wolnych kwasów tłuszczowych (WKT), tym samym wzrostu stężenia glukozy we krwi i w konsekwencji zwiększonego wydzielania insuliny. Wzrost stężenia insuliny jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym zarówno jeśli chodzi o ryzyko zachorowania na raka piersi jak i skuteczność leczenia. Na powierzchni komórek gruczołu piersiowego znajdują się receptory dla insuliny oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1). Związanie się insuliny z receptorem aktywuje kinazę tyrozynową i stymuluje fosforylację reszt tyrozynowych, między innymi swoistych cząsteczek sygnalizacyjnych, na przykład IRS-1 (substrat 1 receptora insulinowego), które przez odpowiednie przekaźniki docelowo powodują aktywację izoforny kinazy p42/p44 MAP istotnej dla procesu namnażania i różnicowania komórek. (35,36)

Zmiany w poziomie hormonów przysadki mózgowej, również mogą wpływać na rozwój raka gruczołu piersiowego. Folikulotropina (FSH) i luteotropina (LH) są odpowiedzialne za syntezę estrogenów poprzez stymulację wydzielania androgenów przez jajniki (LH) i ich aromatyzację do estrogenów (FSH). Ponadto, w wielu komórkach organizmu, w tym w komórkach gruczołu piersiowego oraz komórkach raka gruczołu piersiowego, zidentyfikowano receptory dla luteotropiny (LHR). Połączenie się hormonu z receptorem LHR może pobudzać syntezę estrogenów wewnątrz guza i tym samym stymulować jego rozwój.

Kolejnym czynnikiem ryzyka inicjacji i progresji procesu nowotworowego jest długotrwałe przyjmowanie leków hormonalnych czyli hormonalna terapia zastępcza stosowana dłużej niż 5 lat oraz antykoncepcja hormonalna. Wykazano, że stosowanie doustnej antykoncepcji u kobiet poniżej 25 roku życia zwiększa ryzyko raka piersi o 35%.

(28) W związku z tym przeciwwskazaniem do stosowania doustnej antykoncepcji jest młody wiek oraz obecność mutacji w genie *BRCA1*. Ponadto, stosowanie leków zawierających estrogeny u chorych po zakończeniu leczenia raka piersi zwiększa prawdopodobieństwo nawrotu choroby.

Nie tylko zaburzenie poziomu hormonów płciowych jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym. Postuluje się także, że nieprawidłowy poziom hormonów tarczycy zarówno nadczynność jak i niedoczynność, zwłaszcza jeśli podłoże choroby jest autoimmunologiczne, zwiększa ryzyko raka piersi. (37) Może to wynikać z udziału hormonów tarczycy w produkcji estrogenów oraz dodatnią zależnością pomiędzy obecnością procesu zapalnego a nowotworzeniem. Stan zapalny to fizjologiczny proces, za pomocą którego organizm broni się przed zakażeniem bakteryjnym czy uszkodzeniem tkanek. (38) Jednakże w chorobach autoimmunologicznych m.in. chorobie Hashimoto (autoimmunologicznemu zapaleniu tarczycy) doprowadza do patologicznej, niekontrolowanej reakcji układu immunologicznego i przewlekłego stanu zapalnego. (39) Leukocyty i makrofagi mobilizowane w procesie zapalnym wytwarzają wolne rodniki, które uszkadzają DNA komórek dzielących się i w efekcie mogą inicjować proces kancerogenezy. Ponadto, częstość występowania mutacji w genie *p53* u osób z chorobą autoimmunologiczną, taką jak reumatoidalne zapalenie stawów czy wrzodziejące zapalenie jelita, była porównywalna do tej obserwowanej u osób z chorobą nowotworową. (40) W przebiegu chorób autoimmunologicznych uwalniany jest także szereg chemokin, które, jak się postuluje, mogą stymulować rozwój procesu nowotworzenia. U kobiet z rakiem piersi obserwuje się wzrost stężenia interleukin IL-6, IL-8, IL-10 co koreluje z gorszym rokowaniem i szybszym rozwojem choroby. (41) Zaobserwowano także, że osoby chore na chorobę Hashimoto mają istotnie statystycznie większe ryzyko zachorowania na szereg innych nowotworów, w tym także raka piersi. (42)

1.2.3. Leki jako czynnik ryzyka raka piersi

Kolejnym czynnikiem mogącym zwiększać prawdopodobieństwo rozwoju raka piersi są niektóre leki. Dietylstilbestrol (DES) to syntetyczny estrogen stosowany w leczeniu m.in. gonokokowych zapaleń pochwy u ciężarnych. Lek ten wycofano ze sprzedaży w 1997 roku ze względu na wzrost ryzyka zachorowania na raka piersi przez kobiety, których matki w czasie ciąży przyjmowały DES. (43) Digoksyna z kolei jest lekiem z grupy glikozydów nasercowych, wyizolowanym z naparstnicy włnistej (*Digitalis lanata*). Wpływa na mięsień sercowy, mięśnie poprzecznie prążkowane i gładkie, cewki nerkowe i ośrodek nerwu błędnego. Zwiększa siłę i szybkość skracania się włókien mięśniowych, hamuje działanie

blonowej pompy sodowo-potasowej przez co zwiększa uwalnianie wapnia z siateczki śródplazmatycznej i tym samym zwiększa napływ jonów wapnia do komórki. Lek ten stosuje się przede wszystkim w niewydolności serca oraz migotaniu i trzepotaniu przedsionków. Zauważono jednak, że u kobiet w okresie pomenopauzalnym digoksyna wykazuje działanie estrogenowe i znacząco zwiększa, o około 40%, prawdopodobieństwo zachorowania na raka piersi. Ryzyko to jest zależne od obecności receptorów estrogenowych i jest wyższe u kobiet z dodatnim receptorem estrogenowym. Zaprzeszanie przyjmowania leku zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia raka piersi do poziomu wyjściowego. (44) Lek ten, ze względu na swoje estrogenowe działanie, u mężczyzn może mieć też korzystne, przeciwnowotworowe działanie, gdyż zmniejsza ryzyko raka prostaty. (45)

1.2.4. Anatomiczne predyspozycje do inicjacji raka piersi

Ryzyko raka piersi zwiększają także anatomiczne predyspozycje. U kobiety z gęstszym utkaniem gruczołu piersiowego obserwuje się 3-5 krotnie większe ryzyko wystąpienia raka piersi. (46) Ponadto nienowotworowe choroby gruczołu piersiowego takie jak atypowy rozrost sutka oraz gwiaździsta blizna, hiperplazja gruczołu piersiowego także są niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi. (47) Uznaje się także, że obecność nowotworu w jednej piersi zwiększa 2-5 krotnie prawdopodobieństwo wystąpienia nowotworu, nie będącego przerzutem, w drugiej piersi. (48,49) Dodatkowym czynnikiem mogącym sugerować, że w danej populacji kobiet wystąpi nowotwór sutka jest zwiększona gęstość kości. Zależność ta wynika z różnych ilości estrogenów we krwi oraz czasu ekspozycji na ten hormon. (50)

1.2.5. Molekularne czynniki ryzyka raka piersi

Zaobserwowano, że 15-20% przypadków nowotworów występuje rodzinnie a w 5-10% przypadków skłonność do powstawania nowotworu jest dziedziczna. Muszą zatem istnieć pewne predyspozycje genetyczne, zwiększające ryzyko powstania raka, także raka piersi. Szereg czynników, które mogą korelować z rozwojem procesu nowotworzenia został już wykazany. Jednakże, na rozwój nowotworu ma wpływ wiele zmian w materiale genetycznym a o tym czy rozwinie się nowotwór decyduje stopień zmian w strukturze i sekwencji DNA, miejsce jego uszkodzenia oraz ilość zmian w procesach regulujących funkcjonowanie komórki/DNA. W związku z tym, że nowotwory uwarunkowane genetycznie różnią się od nowotworów sporadycznych m.in przebiegiem klinicznym i odpowiedzią na

leczenie, poszukuje się kolejnych markerów molekularnych, których wczesne wykrycie usprawni diagnostykę oraz przyspieszy wykrywanie raka piersi i tym samym poprawi skuteczność terapii oraz czas życia pacjentek i pacjentów.

Markery molekularne wykorzystuje się w określaniu predyspozycji do zachorowania na nowotwór, diagnozowaniu choroby, jej przebiegu i wyborze terapii oraz odpowiedzi na leczenie. Spośród markerów nowotworowych możemy wyróżnić markery genowe i prognostyczne.

1.2.6. Markery genowe

Markery genowe wykorzystywane są do oceny ryzyka wystąpienia nowotworu. Wśród nich znajdują się polimorfizmy i mutacje identyfikowane w genomie komórek nowotworowych, dzięki czemu możliwa jest personalizacja leczenia, określenie stopnia zaawansowania choroby oraz prognozowanie jej przebiegu.

Spośród opisanych zmian genetycznych wykorzystywanych do określania ryzyka zachorowania na raka piersi najczęściej występującymi (16-40% przypadków) są mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2*. Mutacje te w rodzinach z agregacją zachorowań na raka piersi i/lub jajnika stanowią 16-25%, a kolejne 5% to mutacje w genach *TP53*, *PTEN*, *ATM*, *CHEK2*, (rolę poszczególnych genów objaśniono poniżej).

BRCA1* i *BRCA2 – ang. *Breast cancer type 1*, geny te należą do klasy genów supresorowych i zlokalizowane są odpowiednio na długim ramieniu chromosomu 17 w locus 17q21 (*BRCA1*) i chromosomu 13 w locus 13q12 (*BRCA2*). Produktem ekspresji tych genów są białka odpowiedzialne za procesy naprawy pęknięć w łańcuchu DNA, regulację transkrypcji i cyklu komórkowego. (51) Białka *BRCA1* i *BRCA2* są także konieczne do zachowania stabilności chromosomów oraz regulują funkcje szeregu białek m.in. uczestniczących w procesie apoptozy (*BAX*, *BCL-2*, *p53*). Ryzyko wystąpienia raka piersi u kobiet będących nosicielkami mutacji *BRCA1*, w których najbliższej rodzinie (babcia, mama, ciocia lub siostra) wystąpił rak piersi wzrasta do 80% natomiast w przypadku mutacji genu *BRCA2* do 45%. Mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2* prowadzą także do wzrostu ryzyka zachorowania na szereg nowotworów u mężczyzn: piersi, prostaty, jelita grubego, trzustki. Szacuje się, że 10-16% mężczyzn jest nosicielami mutacji *BRCA1* a w przypadku genu *BRCA2* częstość mutacji w niektórych populacjach wynosi nawet 40%. (52)

TP53 – ang. *Tumore Protein 53*, u ludzi gen ten zlokalizowany jest na chromosomie 17p13.1 (znaleziono także analogi zwierzęce np. u myszy na chromosomie 11., u szczura na 10., u psa na 5., a u świni na 12). W jego skład wchodzi 11 eksonów, które kodują niewielkie białko p53 o masie cząsteczkowej 53kD i długości 393 aminokwasów. (53) Główną funkcją tego białka jest zapobieganie powielaniu komórek zawierających uszkodzone DNA poprzez zatrzymanie podziałów tych komórek i indukcję apoptozy. (54) Mutacje w genie *TP53* najczęściej dotyczą odcinka odpowiedzialnego za jego aktywność biologiczną (od 5 do 8 eksonu) i w 75% przypadków są to mutacje typu zmiany sensu. W przypadku nosicielstwa mutacji prawdopodobieństwo wystąpienia nowotworu złośliwego przed 30. rokiem życia wynosi 50% podczas gdy populacyjne ryzyko w tej grupie wiekowej wynosi 1%. (55) Mutacje w genie *TP53* obserwuje się także u osób chorujących na nowotwór złośliwy, a ich częstość jest zależna od typu nowotworu i waha się w zakresie 5 – 80% przypadków. Niezwykle rzadko obserwuje się mutacje germinalne w genie *TP53*, które odpowiadają za wystąpienie zespołu Li-Fraumeni. U chorych z tym zespołem zwiększa się prawdopodobieństwo zachorowania na liczne nowotwory (kostniakomięsaki, mięsaki, nowotwory mózgu, białaczki). Ryzyko zachorowania na raka piersi wynosi u nich 28-56% a szczyt zachorowania przypada na 20-40 rok życia.

PTEN – ang. *Phosphatase and tensin homolog*, gen ten zlokalizowany jest na chromosomie 10q23 i zawiera 9 eksonów a jego produktem jest białko PTEN o długości 403 aminokwasów. Najważniejszą funkcją tego białka jest kontrola cyklu komórkowego, a także kontrola procesów migracji i adhezji komórek oraz powstawania naczyń krwionośnych. (56)

Zaburzenia ekspresji genu *PTEN*, będące efektem szeregu mutacji, zostały zaobserwowane zarówno w dziedzicznych jak i sporadycznych przypadkach nowotworów. Mutacje germinalne genu *PTEN* odpowiedzialne są za powstanie zespołu Cowden oraz Bannayan-Riley-Ruvalcaba. Zespół Cowden jest rzadką chorobą, której efektem jest zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwory łagodne i złośliwe piersi, przewodu pokarmowego, tarczycy, pęcherza oraz jajników. Szczyt zachorowania na nowotwory piersi u osób z zespołem Cowden przypada na 30 – 35 rok życia. W wielu sporadycznych nowotworach piersi zaobserwowano także spadek ilości białka PTEN. Zmiana ta wynika z zaburzeń genetycznych oraz epigenetycznych w genie, głównie ze zwiększonej metylacji sekwencji dinukleotydowych wysp CpG w regionie promotora.

ATM – ang. *Ataxia Teleangiectasia Mutated*, gen ten znajduje się na chromosomie 11q22.3, składa się z 66 eksonów a produktem jego ekspresji jest białko ATM. Białko to ma masę cząsteczkową 350kDa i długość 3056 aminokwasów. Główną funkcją tej kinazy jest udział w sygnalizacji i odpowiedzi na uszkodzenia dwuniciowej struktury DNA.

Mutacje w genie *ATM* warunkują powstanie dziedzicznego zespołu ataksja – teleangiektazja, który charakteryzuje się ataksją mózdkową, teleangiektazją w obrębie skóry i gałek ocznych, zaburzeniami immunologicznymi powodującymi zapalenia głównie dróg oddechowych, nadmierną wrażliwością na promieniowanie jonizujące a także zwiększoną predyspozycją do zachorowania na nowotwory złośliwe m.in. raka piersi. (Mongone 2015) Ryzyko zachorowania na raka przed 40 rokiem życia wśród osób z zespołem A-T wynosi 38% a zachorowania na raka piersi u kobiet wzrasta 5-9 krotnie. Ponadto w 8% sporadycznych przypadków raka piersi zaobserwowano także mutacje w genie *ATM*. (57)

CHEK2 - ang. *Checkpoint kinase 2* gen znajduje się na chromosomie 22q12.1 i składa się z 14 eksonów. Produktem genu jest kinaza CHEK2 będąca białkiem supresorowym i zapobiegająca niekontrolowanym podziałom komórek. Dlatego mutacje w genie *CHEK2*, czego efektem jest nieprawidłowa funkcja białka, predysponują do powstania nowotworów. Najczęściej występujące mutacje to del5395, IVS2_1G_A, 1100delC oraz I157T a ich wpływ na rozwój raka piersi jest znaczący. (58) U kobiet będących nosicielkami mutacji w genie *CHEK2* ryzyko zachorowania na raka piersi wynosi 20%. W przypadku wystąpienia nowotworu piersi u krewnej drugiego stopnia ryzyko to wzrasta do 28% a u krewnej pierwszego stopnia do 34%. W przypadku wystąpienia nowotworu u obu krewnych ryzyko rośnie do 44% podczas gdy ryzyko populacyjne wynosi 6%. (59) Jak wykazano, mutacje w genie *CHEK2* predysponują również do wystąpienia zespołu Li-fraumeni nawet u pacjentów nie będących nosicielami mutacji w genie *TP53*.

1.2.7. Markery prognostyczne

Markery prognostyczne służą do przewidywania zmian jakie nastąpią w komórce nowotworowej i w konsekwencji określenia prognozowanego czasu przeżycia pacjenta, czasu wolnego od choroby oraz wystąpienia ewentualnej wznowy. Spośród markerów prognostycznych najczęściej wykorzystuje się ocenę ekspresji receptorów (HER2, ER, PgR) oraz ilość białka Ki-67, markera proliferacji.

HER2 - receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *Human Epidermal Growth Factor*) należy do rodziny transbłonowych receptorów i jest produktem ekspresji genu *ERBB2*. (60) Receptor ten znajduje się na powierzchni prawidłowych komórek w ilości około 50 tys. cząsteczek białka na komórkę. W około 15-25% przypadków raka piersi dochodzi do nadekspresji genu *ERBB2* i wzrostu poziomu monomerów HER2 o 10-100 razy i w konsekwencji zwiększonej aktywności białka. Wysoka aktywność HER2 jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym ponieważ koreluje z wyższym stopniem histopatologicznej złośliwości, wysoką aktywnością proliferacyjną, przerzutami do węzłów chłonnych i narządów odległych. Ponadto wykazano, że wzrost amplifikacji genu *ERBB2* ma związek ze zwiększonym potencjałem migracyjnym komórek nowotworowych i tym samym ich inwazyjnością, zahamowaniem apoptozy i nasileniem angiogenezy. Ponadto określenie ilości receptorów HER2 na powierzchni komórek nowotworowych jest jednym z czynników determinujących dobór terapii. Zaobserwowano, że u kobiet z nadekspresją HER2 zablokowanie tego receptora poprzez swoiste przeciwciało monoklonalne IgG1 skutkuje lepszą odpowiedzią na stosowaną terapię i tym samym wydłużeniem czasu życia pacjenta. (61)

ER i PgR – receptory estrogenowe (ang. *estrogen receptor*, ER) i progesteronowe (ang. *progesteron receptor*, PgR) fizjologicznie obecne są na powierzchni komórek m.in. gruczołu piersiowego i po połączeniu się z hormonami steroidowymi stymulują rozwój gruczołu piersiowego. Zaobserwowano jednak, że ich nadekspresja w komórkach raka piersi jest niekorzystnym prognostycznie markerem i koreluje z krótszym czasem przeżycia. Z drugiej jednak strony obecność ER i PgR umożliwia dobór celowanej terapii z zastosowaniem blokerów, które kompetycyjnie wiążą się z receptorem estrogenowym. W wyniku czego dochodzi do zmniejszenia syntezy czynników wzrostu ekspresji receptorów progesteronowych a w konsekwencji do zahamowania podziałów komórkowych i wydłużenia czasu życia pacjentek z rakiem piersi. (62)

Ki-67 – to jądrowe białko uważane jest za marker proliferacji komórkowej, którego ekspresja obserwowana jest we wszystkich aktywnych fazach cyklu komórkowego oprócz fazy G0. Największy wzrost poziomu Ki-67 obserwuje się w czasie mitozy. Prawdopodobnie bierze ono udział w podziałach komórki oraz w procesie syntezy rRNA. Białko to jest kodowane przez gen *MKI67* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 10 (10q25). (63)

Wykazano zależność pomiędzy wysokim poziomem markera Ki-67 a wyższym stopniem zaawansowania choroby, większym stopniem złośliwości, skłonnością do przerzutów oraz krótszym czasem przeżycia pacjenta. Ponadto wysoki poziom Ki-67 koreluje z dużym ryzykiem nawrotu choroby nowotworowej. (64)

1.3. Nowe markery molekularne

W związku ze wzrostem częstości występowania nowotworów piersi poszukuje się nowych markerów, które umożliwią szybszą i bardziej precyzyjną diagnostykę oraz usprawnią terapię i umożliwią przewidywanie kolejnych etapów rozwoju raka piersi. Ze względu na częste uwarunkowania genetyczne nowotworu poszukuje się genów, których mutacje odpowiadają za inicjację procesu nowotworzenia, a niedobór lub nadmiar produktów ekspresji tych genów może przyspieszyć rozwój raka piersi.

Postuluje się, że polimorfizmy genów *LEP*, *LEPR* i *ABCBI* mogą korelować z częstszym zachorowaniem na raka piersi. Wynika to z faktu, że leptyna będąca produktem ekspresji genu *LEP* jest cytokiną, która może promować proliferację komórek nowotworowych poprzez modulację środowiska pozakomórkowego, obniżenie potencjału apoptotycznego komórki oraz wzrost aktywności genów antyapoptotycznych. (30) Poziom leptyny w surowicy krwi jest, jak się wydaje, zależny od wariantów genów kodujących leptynę (gen *LEP*) oraz receptor leptynowy (gen *LEPR*).

Gen *ABCBI* natomiast koduje glikoproteinę P, białko, którego główną funkcją jest usuwanie ksenobiotyków z komórki i tym samym zabezpieczenie jej przed ich kancerogennym działaniem. Zmniejszona aktywność białka wynikająca z obecności polimorfizmu, może doprowadzić do kumulacji ksenobiotyków w komórce, uszkodzeniu DNA i transformacji nowotworowej. Uważa się także, że polimorfizmy w genie *ABCBI*, poprzez modulację aktywności glikoproteiny P, mogą korelować ze zmienną odpowiedzią na leczenie przeciwnowotworowe i tym samym wpływać na długość życia pacjentek.

1.4. Leptyna i receptor leptynowy

1.4.1. Budowa i funkcja leptyny

Leptyna jest hormonem o masie cząsteczkowej 16 kDa i długości 167 aminokwasów, produktem ekspresji genu *LEP*. Białko to swoją dojrzałą i aktywną postać uzyskuje po obróbce potranslacyjnej w wyniku odcięcia peptydu sygnałowego o długości 21 aminokwasów od pro-leptyny, której masa cząsteczkowa wynosi 18k Da. Leptyna w swojej dojrzałej postaci zostaje uwolniona do krwioobiegu po połączeniu z rozpuszczalną formą receptora leptynowego. Powstanie kompleksu leptyny z receptorem przyczynia się do zwiększenia stabilności białka oraz wydłużenia okresu jego półtrwania. (65) Leptyna wydzielana jest przede wszystkim przez tkankę tłuszczową, ale także w niewielkim stopniu przez ślinianki, śluzówkę żołądka, endometrium w trakcie implantacji zarodka, łożysko, jajniki, wątrobę, przysadkę mózgową czy mięśnie szkieletowe. (31) Wydzielanie białka do krwioobiegu ma charakter dobowy ze szczytem w godzinach nocnych (2-4) a stężenie leptyny jest zależne od płci i ze względu na ilość tkanki tłuszczowej jest wyższe u kobiet niż u mężczyzn,

Najważniejszą funkcją leptyny jest regulacja ośrodka głodu znajdującego się w podwzgórzcu i tym samym regulacja wydatkowania energii oraz przyjmowania pokarmów. Jednakże leptyna jest białkiem o działaniu plejotropowym i wykazuje szereg innych funkcji. Leptyna należy do rodziny helikalnych cytokin klasy pierwszej i ma podobną strukturę do interleukin IL-6, IL-12, IL-15, prolaktyny, hormonu wzrostu, czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (GCSF) i onkostatyny M. (31) Dlatego też, jak wykazano, leptyna reguluje działanie układu odpornościowego. Stymuluje układ immunologiczny poprzez wzrost proliferacji monocytów, makrofagów i limfocytów Th, a także poprzez wzrost produkcji cytokin prozapalnych np. IL-1beta, IL6, TNFalfa. Pobudza też chemotaksję neutrofilii oraz uwalnianie przez nie wolnych rodników tlenowych a także wzmacnia proliferację i cytotoksyczność komórek NK. Leptyna reguluje również odporność nabytą poprzez zwiększenie komórki grasicy, udział we wzroście, różnicowaniu, proliferacji i aktywacji limfocytów T.

Hormon ten aktywuje szlak sygnalizacji STAT3 zależny od kinazy Janus JAK2/STAT3 (ang. *Janus kinase 2-Signal transducer and activator of transcription 3*) dzięki czemu wzmacnia proliferację komórek śródbłonna naczyń a także stymuluje produkcję czynników angiogennych takich jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) i czynnik wzrostu fibroblastów FGF (ang. *Fibroblast Growth Factor*) i tym samym wzmacnia angiogenezę. Wielokierunkowo reguluje glikemię

w organizmie: bezpośrednio stymuluje wyspy beta trzustki do wydzielania insuliny, uwrażliwia komórki obwodowe na działanie insuliny oraz pośrednio, poprzez hamowanie ośrodka głodu w podwzgórzu zmniejsza poziom glukozy. (66) Działa także protekcyjnie na układ kostny poprzez zwiększanie proliferacji i różnicowania osteoblastów. Wpływa na płodność, cykl menstruacyjny, ciążę oraz laktację przede wszystkim poprzez stymulację wydzielania hormonu wydzielającego gonadoliberyny GnRH (ang. *Gonadotropin-Releasing Hormone*), hormonu folikulotropowego FSH (ang. *Follicle-Stimulating Hormone*) i hormonu luteinizującego LH (ang. *Luteinizing Hormone*). Dodatkowo reguluje funkcjonowania osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalnej i tym samym odpowiada za hormonalną czynność gonad. (67,68) Ponadto w prawidłowym cyklu menstruacyjnym leptyna dodatnio koreluje z poziomem estrogenów i ze względu na podobne rozmieszczenie w układzie nerwowym (przede wszystkim w podwzgórzu) receptorów estrogenowych i leptynowych wykazują podobne działanie t.j. hamujące łaknienie.

Obecność leptyny w surowicy krwi, a zwłaszcza jej nadmiar, może wywoływać niekorzystny efekt metaboliczny. Zaobserwowano zależność pomiędzy wzrostem stężenia leptyny a zwiększonym zachorowaniem na raka piersi, który wynika najprawdopodobniej z prozapalnego, proangiogenego i prokancerogenego działania białka. (69) Zarówno w badaniach *in vitro* jak *in vivo* wykazano, że leptyna stymuluje wzrost guza oraz migrację komórek, tym samym zwiększa ryzyko wystąpienia przerzutów odległych. Leptyna, może także regulować działanie receptora estrogenowego alfa, znajdującego się na powierzchni komórek gruczołu piersiowego. W wyniku tego oddziaływania dochodzi do wydzielania aromatazy, hormonu zwiększającego aromatyzację androgenów do estrogenów, wzrostu stężenia estrogenów i zwiększenia ryzyka zachorowania na estrogenozależnego raka piersi. (70) Dodatkowo leptyna uniemożliwia degradację ERalfa przez co wzmacnia jego działanie. (33) Ponadto, istnieje sprzężenie zwrotne, w którym 17beta-estradiol wzmacnia syntezę leptyny w adipocytach, która po połączeniu z receptorem leptynowym, transaktywuje gen receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu 2 (ERBB2). W efekcie dochodzi do wzrostu ilości HER2 na powierzchni komórek, co odgrywa znaczącą rolę w transformacji nowotworowej gruczołu piersiowego oraz koreluje z bardziej agresywną postacią choroby i opornością na terapię hormonalną. (71) Leptyna działa także proangiogenne i prozapalnie przez co wzmacnia inicjację i progresję nowotworu. Działając synergistycznie z IL-1 aktywuje NFkappaB, w wyniku czego wzrasta poziom VEGF i tym samym biosynteza nowych naczyń krwionośnych. Leptyna stymuluje wydzielanie makrofagów, które w dalszym etapie stymulują zależną od leptyny produkcję cytokin prozapalnych (IL-1, TNFalfa, IL-1, IL-12).

(31) Z jednej strony wzrost np. TNF α hamuje proliferację komórek raka piersi oraz zmniejsza ryzyko przerzutów z drugiej strony IL-1 stymuluje komórki do podziałów, promując angiogenezę, wzrost guza i zdolność do przerzutów. Ponadto w surowicy krwi kobiet z rakiem piersi oraz w komórkach raka gruczołu piersiowego zaobserwowano wzrost stężenia leptyny oraz IL-6. (72) Zależność ta jest złym czynnikiem rokowniczym i koreluje z gorszą odpowiedzią na terapię oraz krótszym czasem przeżycia. Efekt prokancerogenne działanie leptyny jest wzmacniany przez jej autokrynne działania w komórkach nowotworowych. Wykazano bowiem większą ekspresję receptora leptynowego w komórkach raka gruczołu piersiowego, względem komórek prawidłowych. Obecność tego receptora niekorzystnie rokuje i koreluje z większym rozmiarem guza, przerzutami do węzłów chłonnych i odległymi, krótszym czasem wolnym od wznowy choroby oraz z większym stopniem zaawansowania choroby. (64,73) Ponadto leptyna zwiększa ekspresję XIAP (ang. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*, inhibitor apoptozy zależny od chromosomu X), który wtórnie hamuje apoptozę komórek nowotworowych. (74)

Wzrost stężenia leptyny w surowicy wynikać może ze wzmożonej produkcji przez nadmierną ilość tkanki tłuszczowej lub braku wrażliwości receptora leptynowego na działanie leptyny i tym samym, w wyniku sprzężenia zwrotnego pobudzania adipocytów do produkcji leptyny. Produkcja leptyny może też być zależna od poziomu ekspresji genów *LEP* i *LEPR*, która regulowana jest m.in. przez polimorfizmy genów.

1.4.2. Gen *LEP*

Leptyna jest produkowana przez gen *LEP*, który znajduje się na długim ramieniu chromosomu siódmego (7q31.1) (75) i w 84% wykazuje homologię względem mysiego genu otyłości *ob*. (76) Zahng i wsp. w badaniach przeprowadzonych na myszach, po raz pierwszy zidentyfikowali gen otyłości i nazwali go genem *ob*. (ang. *obesity*, otyłość). (76). Rok później Isse i wsp. zidentyfikowali i opisali ludzki gen otyłości *LEP*, który znajduje się na chromosomie 7 i składa się z 3 odcinków kodujących (eksony) przedzielonych dwoma odcinkami niekodującymi (introny). (77) Długość całego genu szacuje się na około 35kpz w tym region kodujący obejmuje 3426 pz. (76,77) Ekson pierwszy składa się z 29, drugi z 172 natomiast ekson trzeci, największy, ma długość 3225 pz. Fragmenty ulegające translacji znajdują się w części eksonu 2 oraz 3. Na końcach 5' i 3' transkryptu genu znajdują się sekwencje nie podlegające translacji (UTR, ang. *untranslated region*). Wykazano, że 3'UTR zawiera powtarzalne sekwencje Alu, rozciągające się od pozycji 30831 do 3370 a na końcu 3' mRNA znajduje się sekwencja AATAAA. (78) Wykazano także obecność

sekwencji flankujących gen *LEP* w rejonie 5' oraz 3'. 5' flankujący region zawiera wszystkie niezbędne do inicjacji transkrypcji motywy zatem uważa się ten region za promotorowy, regulujący transkrypcję.

1.4.3. Budowa i funkcja receptora leptynowego

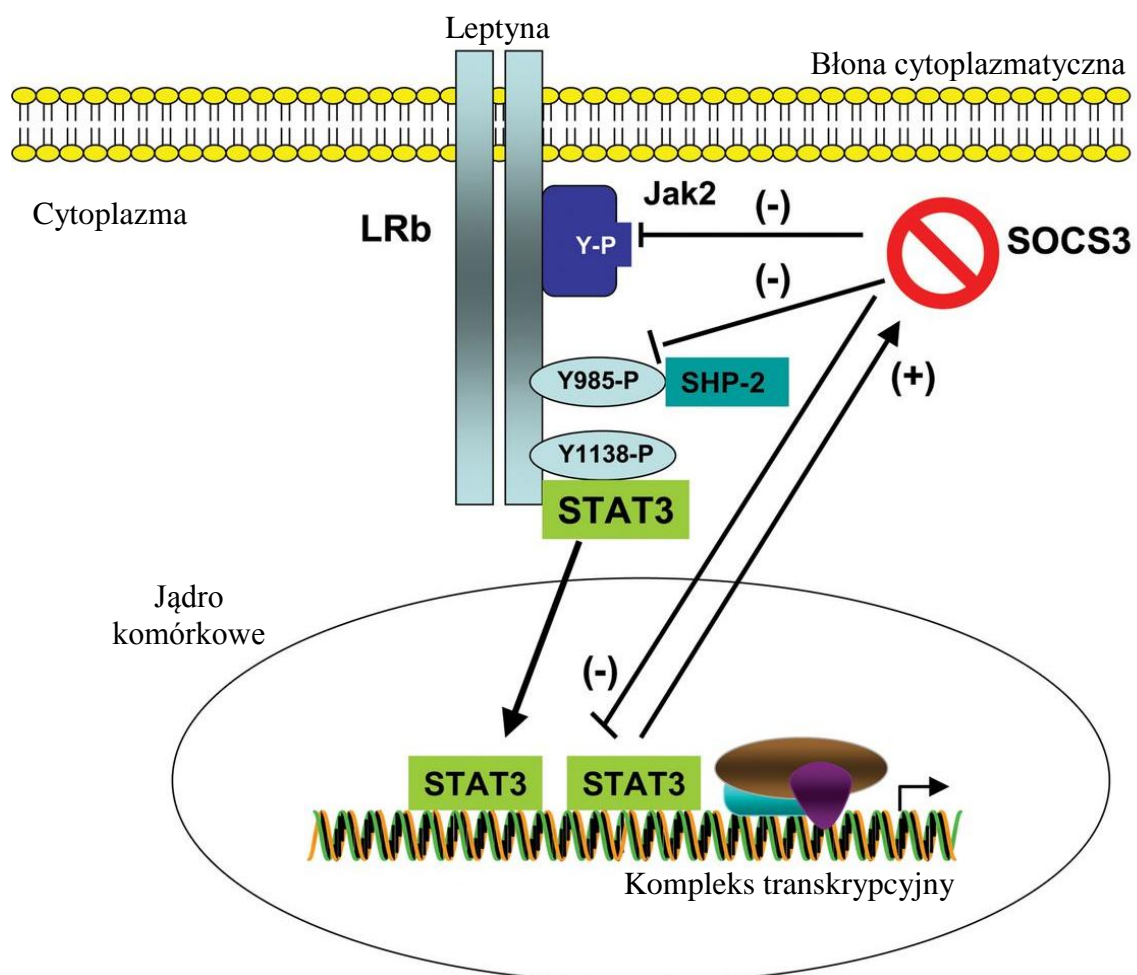
Leptyna efekt biologiczny wykazuje po połączeniu z receptorem leptynowym, który, jak początkowo sądzono, zlokalizowany miał być tylko w podwzgórzu. Obecnie wiadomo jednak, że receptor ten znajduje się również w 25 innych narządach. Jego najwyższy poziom obserwuje się w wątrobie, jajnikach, tkance tłuszczowej, endometrium pęcherzyku żółciowym, płucach. (79)

Receptor leptynowy jest polipeptydem będącym produktem ekspresji genu *LEPR* i należy do I klasy nadrodziny cytokin. Zbudowany jest z dwóch łańcuchów polipeptydowych połączonych krótkim fragmentem przezbłonowym. W części zewnątrzkomórkowej receptora leptynowego znajduje się domena białkowa o masie 130kD i w związku z tym zalicza się go do rodziny cytokin gp130. (80) W wyniku przyłączenia się liganda-leptyny do zewnątrzkomórkowej domeny zawierającej 130kDa dochodzi do zmiany konformacji białka i aktywacji ścieżki JAK/STAT zależnej. Efekt biologiczny jaki wywoła aktywacja ścieżki JAK/STAT jest zależny od rodzaju izoformy receptora oraz miejsca fosforylacji. (81)

Ze względu na alternatywne składanie genu *LEPR* wyróżnia się 6 izoform receptora leptynowego, które posiadają taką samą, zewnątrzkomórkową część wiążącą leptynę, jednakże różnią się budową domeny wewnątrzkomórkowej. (82) Izoformy a, b, c, d i f są przezbłonowymi receptorami i zawierają sekwencje box1 do której przyłącza się kinaza Janus 2 (JAK2) oraz 303-aminokwasowy fragment transbłonowy. Natomiast izoforma e jest rozpuszczalną formą receptora leptynowego, nie zawiera domeny przezbłonowej, a jej celem jest wiązanie krążącej w krwioobiegu leptyny i blokowanie jej działania. (83) W badaniach przeprowadzonych na ludziach wykazano, że rozpuszczalna forma receptora leptynowego może powstawać w wyniku rozpadu jego domen wewnątrzkomórkowych pod wpływem działania metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej MMP. Połączenie się leptyny z rozpuszczalną formą receptora leptynowego z jednej strony zapobiega degradacji oraz wydalaniu hormonu a z drugiej strony uniemożliwia przyłączenie się leptyny do receptora znajdującego się na powierzchni komórek. (84)

Najczęściej występującą formą przezbłonową receptora leptynowego jest izoforma b (LEPRb). Po utworzeniu kompleksu leptyna-LEPRb dochodzi do aktywacji kinazy JAK2, a w konsekwencji do fosforylacji kinazy JAK2 oraz trzech reszt tyrozyny w obrębie LEPRb

w pozycji 985, 1077 oraz 1138. (Rycina 3) W zależności od tego, w którym miejscu dochodzi do fosforylacji receptor leptynowy pełni inną funkcję. Fosforylacja tyrozyny 985 aktywuje ścieżkę sygnałową zależną od białka zawierającego domenę SH2 (SHP-2, ang. *SH2-domain-containing protein*) i kinazy MAP i w wyniku tego dochodzi do zahamowania przekazywania sygnału aktywowanego przyłączeniem leptyny. Fosforylacja tyrozyny 1077 natomiast aktywuje ścieżkę STAT5-zależną i pobudzając m.in. spermatogenezę. (83) Ponadto w badaniach na myszach wykazano, że fosforylacja tyrozyny 1077 bierze udział w regulacji masy ciała poprzez zmniejszenie ilości tkanki tłuszczowej i w efekcie regulują cykl miesięczkowy. (46) Z kolei fosforylacja tyrozyny w pozycji 1138 aktywuje ścieżkę sygnałową zależną od STAT3 i w efekcie stymuluje komórki układu neuroendokrynnego z jednoczesnym brakiem efektu na układ rozrodczy. (83)

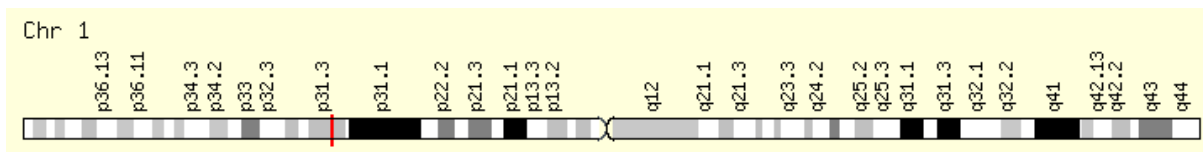


Rycina 3. Schemat aktywacji receptora leptynowego

Leptyna po połączeniu się z receptorem leptynowym powoduje fosforylację tyrozyny 985 i 1138 a w efekcie zmianę konformacji białka STAT3 i aktywację białka SOCS. (85)

1.4.4. Gen *LEPR*

Receptor leptynowy kodowany jest przez gen *LEPR*, który u ludzi zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 1 (1p31.3) (Rycina 4).

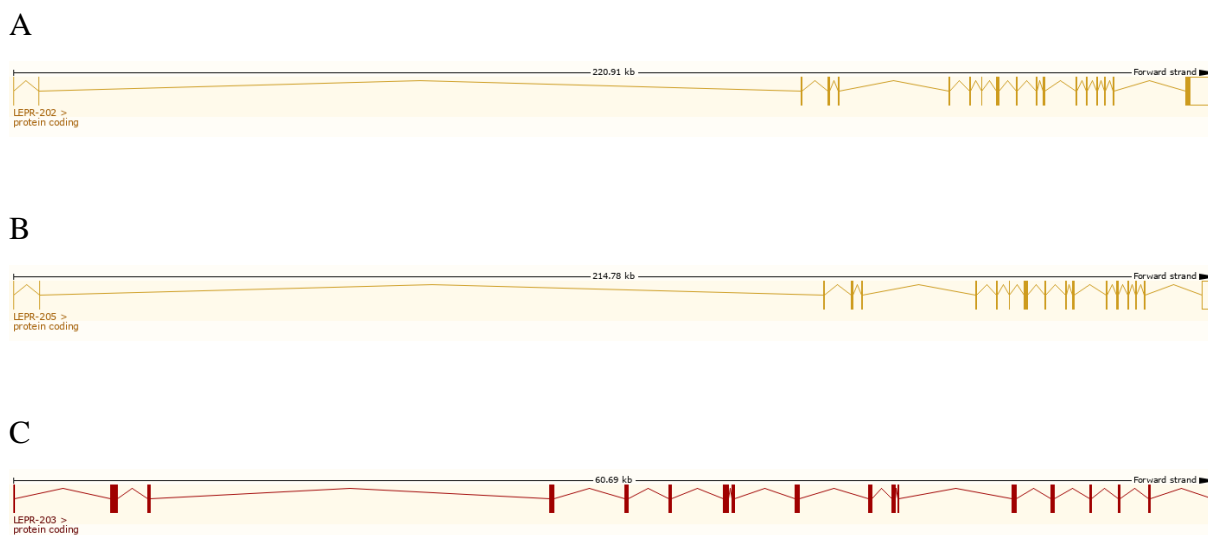


Rycina 4. Schemat struktury ludzkiego chromosomu 1

Kreską czerwoną zaznaczono locusu genu *LEPR* (86)

Zidentyfikowano osiem wariantów genu *LEPR* w tym sześć wariantów splicingowych transkryptu genu kodujących sześć różnych izoform receptora. Wszystkie izoformy receptora leptynowego kodowane przez gen *LEPR* podlegają regulacji przez ten sam pojedynczy promotor oraz posiadają wspólne dwa pierwsze egzony, a różnią się 18 pozostałymi egzonami. W wyniku alternatywnego składania genu powstaje sześć izoform receptora leptynowego różniących się liczbą aminokwasów a tym samym strukturą przestrzenną i właściwościami. (87)

Najdłuższy transkrypt genu *LEPR* ma długość 8227 nukleotydów i zbudowany jest z 18 egzonów kodujących i 2 egzonów niekodujących. Produktem ekspresji tego genu jest długa forma receptora leptynowego zbudowana z 1165 aminokwasów z domeną wewnątrzkomórkową zbudowaną z 303 aminokwasów (Rycina 5A). Warianty mRNA o długości 5135 i 5081 nukleotydów kodują białko zawierające 896 aminokwasów i produkują tym samym receptor leptynowy z domeną wewnątrzkomórkową zbudowaną z 34 aminokwasów (Rycina 5B). Najkrótszy mRNA składa się zaledwie z 2805 nukleotydów zawierających 18 egzonów a produktem ekspresji jest białko zbudowane z 906 aminokwasów (Rycina 5C).

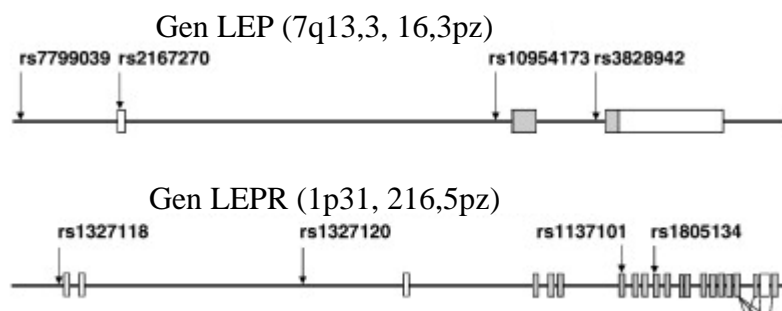


Rycina 5. Schemat składania transkryptu kodującego różne izoformy receptora leptynowego.

A – długa forma receptora leptynowego, B – formy z krótkimi odcinkami wewnątrzkomórkowymi, C – forma rozpuszczalna (87)

1.4.5. Polimorfizmy genów *LEP* i *LEPR*

W obrębie genów *LEP* oraz *LEPR* dotychczas opisano szereg polimorfizmów. Postuluje się, że niektóre z nich mogą korelować ze zmienną aktywnością lub budową kodowanych przez nie białek i tym samym modyfikować efekt biologiczny wywołwany przez połączenie kompleksu leptyna-receptor. Największy wpływ na funkcjonowanie omawianych białek wydaje się mieć zamiana guaniny na adeninę w pozycji 2548G/A genu *LEP* (2548G/A) a także polimorfizmy genu *LEPR* w pozycji 326 (A326G) warunkujące zamianę lizyny na argininę w pozycji 109 receptora leptynowego (109Lys/Arg) oraz w pozycji 668 (668 A/G) czego efektem jest zamiana glutaminy na argininę w pozycji 223 (223Gln/Arg) (Rycina 6).



Rycina 6. Lokalizacja polimorfizmów o znaczeniu klinicznym w genach *LEP* i *LEPR*. Numery rs opisują pozycje polimorfizmów o największym znaczeniu klinicznym. (88,89)

Częstość występowania polimorficznego allelu A genu *LEP* jest zależna od populacji i w populacji tureckiej występuje z 20% częstością (90), w populacji meksykańskiej u 18% obserwuje się allel polimorficzny (91,92), a w populacji brazylijskiej aż u 32% (93). Polimorfizm ten znajduje się w promotorze genu przez co może regulować przyłączanie czynników transkrypcyjnych i tym samym przyczyniać się do zmiany ekspresji genu *LEP* i poziom leptyny w surowicy krwi. (94,95)

Uważa się że obecność homozygot polimorficznych AA oraz heterozygot koreluje z wyższym stężeniem leptyny oraz z otyłością (90), a w konsekwencji ze wzrostem ilości triglicerydów i spadkiem poziomu frakcji cholesterolu o wysokiej gęstości HDL (96). Efekt ten może być konsekwencją oporności komórek układu nerwowego wynikającej ze zmienionej struktury leptyny, braku możliwości połączenia z receptorem leptynowym w podwzgórzu i tym samym zaburzenia regulacji ośrodka głodu. Z drugiej jednak strony zaobserwowano, że polimorficzny allel A obecny u osób otyłych koreluje z niższym stężeniem leptyny w surowicy krwi. Jest to o tyle zaskakujące, że leptyna jest produkowana głównie przez tkankę tłuszczową, której nadmiar obserwuje się u osób otyłych. (97) Przyczyn tej zależności należy prawdopodobnie doszukiwać się w zaburzeniach funkcjonowania receptora leptynowego, będących skutkiem polimorfizmów w genie *LEPR*.

Polimorfizmy 109Lys/Arg oraz 223Gln/Arg są zlokalizowane odpowiednio w eksonach 4 oraz 6 genu *LEPR* kodujących domenę zewnątrzkomórkową receptora leptynowego.

Jest ona odpowiedzialna za wiązanie ligana – leptyny. Zamiana aminokwasów w tej części białka może skutkować zaburzeniem zdolności przyłączania leptyny i tym samym brakiem efektu biologicznego. (98) Ponadto, ze względu na obecność 6 izoform receptora leptynowego, które są wynikiem alternatywnego składania genu, obecność polimorfizmu może również wpływać na ilość poszczególnych izoform. Wykazano bowiem, że homozygoty polimorficzne 223Arg/Arg posiadają wyższe stężenie rozpuszczalnej formy receptora leptynowego (LEPR_e) przy jednocześnie niższym stężeniu leptyny we krwi. (91)

Częstość występowania obydwu form polimorficznych jest zależna od populacji i wśród populacji chińskiej forma polimorficzna Arg (223Lys/Arg) występuje z 73% częstością (99), a w populacji meksykańskiej 41% lub 24% (92). Natomiast formę polimorficzną Arg w pozycji 109 genu *LEPR* obserwuje się u 19% populacji meksykańskiej (92) i 5% Amerykanów (100). Postuluje się, że obydwie polimorfizmy genu *LEPR* korelują z wyższym stężeniem leptyny oraz otyłością i tym samym wzrostem ryzyka wystąpienia nowotworu. (101) Ponadto wykazano zależność pomiędzy współwystępowaniem formy

polimorficznej A (2548G/A, *LEP*) oraz argininy (223Gln/Arg, *LEPR*) a wzrostem zachorowania na raka płuca. (102) Uważa się także, że obecność obydwu polimorfizmów (109Lys/Arg oraz 223Gln/Arg) receptora leptynowego koreluje ze wzrostem ryzyka zachorowania na raka piersi (103) a u osób palących papierosy na raka żołądka. (104)

Z drugiej jednak strony współwystępowanie genotypu AA w pozycji 2548 genu *LEP* oraz polimorfizmu 223Gln/Arg w genie *LEPR* koreluje z niższą wagą, a w konsekwencji z mniejszym ryzykiem rozwoju choroby nowotworowej. (91)

1.4.6. Udział polimorfizmów genów *LEP* i *LEPR* w patomechanizmie raka piersi

Leptyna jest jednym z hormonów, który uczestniczy m.in. w prawidłowym rozwoju gruczołu piersiowego. Jednakże najnowsze badania wskazują, że ze względu na udział hormonu w metabolizmie komórkowym wysokie stężenie leptyny może wywierać niekorzystny wpływ na organizm. Uważa się, że jej nadmiar, wynikający między innymi z obecności polimorfizmów w genach *LEP* i *LEPR* może przyczynić się do inicjacji raka piersi. (105) Wykazano zależność pomiędzy obecnością form polimorficznych 2548G/A *LEP* i 223Gln/Arg a wzrostem częstości zachorowania na raka piersi a także wielkością guza pierwotnego. (105,106) Wydaje się jednak, że obecność polimorfizmu 223Gln/Arg zwiększa ryzyko zachorowania na raka piersi tylko u kobiet w wieku przedmenopauzalnym. Nie zaobserwowano takiej zależności u kobiet starszych. (107) Sugeruje się również, że wystąpienie dwóch czynników jednocześnie tj. polimorfizmu i: otyłości, podeszłego wieku czy wysokiego stężenia hormonów płciowych, zwiększa ryzyko zachorowania na raka piersi. Kobiety w wieku przedmenopauzalnym znacząco częściej chorują jeśli ich BMI przez co najmniej 10 lat jest wyższe niż 24 oraz jednocześnie występują polimorfizmy 2548G/A w genie *LEP* oraz/lub 109Lys/Arg w genie *LEPR*. Natomiast nie zaobserwowano zależności pomiędzy obecnością tych polimorfizmów a wzrostem zachorowania na raka piersi u kobiet z prawidłową masą ciała. (108)

Z drugiej jednak strony, wydaje się że obecność formy dzikiej 2548G/A zwiększa ryzyko zachorowania na raka piersi u kobiet w wieku pomenopauzalnym. (109) Może to wynikać z wpływu leptyny na ekspresję receptorów estrogenowych. Zaobserwowano, że polimorficzna forma dzika GG w pozycji 2548 genu *LEP* koreluje zarówno ze wzrostem stężenia leptyny jak i z ekspresją receptora estrogenowego. Ponadto wzrost stężenia leptyny koreluje ze wzrostem stężenia estrogenów i progresją nowotworu. (110)

1.5. Białko ABCB1

1.5.1. Budowa i funkcja ABCB1

Istotnymi czynnikami mogącymi znacząco wpłynąć na wzrost zachorowania na raka piersi jest palenie tytoniu, nieprawidłowa dieta czy przyjmowane leki. Dochodzi wtedy to kumulacji w organizmie substancji toksycznych-kancerogennych i w efekcie do transformacji nowotworowej. Jednakże w wyniku ekspozycji na substancje toksyczne w komórkach aktywowane są mechanizmy umożliwiające m.in. usuwanie ksenobiotyków z wnętrza komórki. Jednym z białek pełniących funkcję detoksykacyjną jest białko ABCB1.

Białko ABCB1, dawniej zwane glikoproteiną P (PgP) lub białkiem oporności wielolekowej (MDR1, ang. *Multidrug Resistance Protein 1*) jest ATP-zależnym transporterem usytuowanym w błonie komórkowej i należy do grupy białek ABC (ang. *ATP-binding cassette*; kasetta wiążąca ATP). Białko to ma masę cząsteczkową 170 kDa i zbudowane jest z 1280 aminokwasów, które tworzą dwie homologiczne domeny NBD i TMD połączone mostkiem polipeptydowym. (111) Domeny NBD (ang. *Nucleotide Binding domain*) zlokalizowane są w części cytozolowej komórki i w ich obrębie wyróżnia się charakterystyczne motywy Walker A i B oddzielone od siebie fragmentami polipeptydowymi o długości 90-120 aminokwasów. W części tej identyfikuje się również 4 pętle (A, H, D i Q) oraz sekwencję LSSGQ. Sekwencja ta jest oddalona o 15Å od fragmentu wiążącego ATP i jak wykazano, może wraz z ATP oddziaływać na domenę Walker A i regulować dimeryzację białka. (112) Domena transbłonowa natomiast zwana TMD (ang. *Transmembrane domain*) zbudowana jest z 6 alfa-helikalnych fragmentów, które przy udziale kinaz białkowych A i C, ulegają glikozylacji w pozycjach N91, N94 i N99 oraz fosforylacji czterech seryn w pozycji S661, S667, S671 i S683, co warunkuje specyficzność substratową transportera. Wszystkie te elementy biorą udział w przyłączaniu ATP, jego hydrolizie oraz hydrolizie wiązań pomiędzy domenami i w konsekwencji translokacji substratu. (113)

Domeny NBD i TMD układają się cylindrycznie tworząc strukturę o średnicy około 10nm (40 Å) i wysokości 8nm (10 Å). (114) W części środkowej białka znajduje się hydrofilowy kanał o średnicy 5nm skierowany do wnętrza komórki. Natomiast zewnątrzkomórkowa część glikoproteiny P pozostaje zamknięta.

Po połączeniu się z substratem domena NBD zmienia konformację, co umożliwia przyłączenie się cząsteczek ATP i dimeryzację domen NBD. (99) Energia wytworzona w wyniku tych procesów zostaje wykorzystana do rozerwania połączenia pomiędzy domenami TMD i wytworzenia kanału skierowanego na zewnątrz komórki umożliwiającego

usunięcie substratu. W kolejnym etapie ATP ulega hydrolizie i uwolnieniu w postaci ADP do cytozolu a białko ABCB1 wraca do swojej wyjściowej konformacji. (115)

Pgp transportuje przede wszystkim substancje hydrofobowe ale także obojętne czy jony dodatnie o wielkości od 376 Da do 3259 Da zarówno z cytoplazmy jak i z błony komórkowej. Jednakże powinowactwo hydrofobowych substratów znajdujących się w błonie komórkowej do białka ABCB1 jest większe niż substratów znajdujących się w cytoplazmie, w związku z czym, większość ksenobiotyków wychwytywana jest przez nie już w momencie wnikięcia do błony komórkowej.

Fizjologiczną rolą glikoproteiny P jest usuwanie substancji toksycznych z wnętrza komórki i w efekcie także z organizmu. W związku z tym białko to jest obecne na powierzchni komórek wyścielających:

- przewód żółciowy, gdzie sprzyja detoksykacji wątroby,
- jelita, gdzie zmniejsza wchłanianie toksyn/ksenobiotyków/leków/substancji odżywczych z pożywienia
- śródbłonek naczyń, zmniejszając transport toksyn do narządów
- kanaliki bliższe nerek, umożliwiając wydalanie ksenobiotyków wraz z moczem
- łożysko, zmniejszając tym samym transport substancji toksycznych do płodu
- narządy wydzielania wewnętrznego, gdzie transportuje hormony np. kortyzol, kortykosteron, aldosteron
- komórki układu immunologicznego w których transportuje cytokiny i fosfolipidy przez co uczestniczy w odpowiedzi immunologicznej
- komórki układu nerwowego, zabezpieczając je tym samym przed szkodliwym działaniem toksyn. (116,117)

Nadekspresję *ABCB1* zaobserwowano także na powierzchni komórek nowotworowych m.in. komórek raka piersi. W związku z tym, że w spektrum substratowym białka ABCB1 znajduje się szereg leków, w tym chemioterapeutyków (Tabela 2), wpływa to w sposób istotny na efektywność terapii.

Tabela 2. Wykaz substratów białka ABCB1 stosowanych w leczeniu nowotworów. (118)

Nazwa leku	Zastosowanie
Vinkrystyna	Leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej, chłoniaków ziarniczych i nieziarniczych, neuroblastoma
Vinblastyna	Rak piersi, jąder, białaczki, neuroblastoma, chłoniaki ziarnicze i nieziarnicze, mięsak Kaposiego
Tamoksifen	Zaawansowany rak piersi
Doksorubicyna	Indukcja remisji w ostrej nielimfocytowej białaczce u dorosłych, indukcja remisji w ostrej leukocytovej białaczce dzieci
Etopozyd	W kombinacji z innymi chemioterapeutykami w raku jądra, drobnokomórkowy rak płuca, białaczka nielimfocytowa, glejak wielopostaciowy
Paklitaksel	Mięsak Kaposiego, drobno i niedrobno komórkowy rak płuca, zaawansowany rak piersi, rak jajnika
Daktynomycyna	Guz Wilmsa, mięsak Ewinga, rak jądra
Imatinib	Przewlekła białaczka szpikowa z dodatnich chromosomem Philadelphia, zespół mielodystplazyczny/mieloproliferyjny, rak żołądka
Sorafenid	Rak wątroby, nerki
Dasatinib, Nilotinib	Białaczka mielocytowa u dorosłych
Gefitinib	Niedrobnokomórkowy rak płuca
Diethylstilbestrol	Rak prostaty
Docetaksel	Rak piersi, jajnika, niedrobno komórkowy rak płuca
Metotreksat	Ostra białaczka limfocytowa, rak pęcherzyka żółciowego, piersi, płuc, ośrodkowego układu nerwowego
Topotekan	Mięsak Ewinga, neuroblastoma, drobnokomórkowy rak płuc
Gemcitabin	Zaawansowany rak jajnika, rak piersi z przerzutami, niedrobno komórkowy rak płuc, rak trzustki, pęcherzyka żółciowego
Erlotinib	Rak trzustki, niedrobno komórkowy rak płuca

Poziom oraz aktywność glikoproteiny P może zależeć od polimorfizmów obecnych w genie *ABCB1*, co z jednej strony może zabezpieczać przed nadmierną ekspozycją komórki na działanie ksenobiotyków, a z drugiej strony, przy istniejącym nowotworze, może zmniejszać efektywność terapii. W związku z tym istotna jest identyfikacja czynników, mogących wpływać na poziom oraz aktywność tego białka.

1.5.2. Gen *ABCB1*

U ludzi, gen kodujący białko *ABCB1*/glikoproteinę P należy do klasy B, rodziny białek ABC i nosi nazwę *ABCB1*. Występuje również pod nazwami: *CLCS*; *MDR1*; *P-GP*; *PGY1*; *ABC20*; *CD243*; *GP170*; *MGC163296*. Gen ten zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 7 (7q21.12) i składa z dwóch regionów promotorowych (bliższego i dalszego) oraz 28 egzonów o łącznej długości 209 kpz, natomiast cDNA ma długość 4,5kz. (119) Gen *ABCB1* należy do grupy genów, które w obrębie części bliższej promotora nie zawierają sekwencji TATA jednocześnie zawierając odwróconą sekwencję CCAAT (w pozycji -82 do -73), która jest miejscem przyłączania białek YB-1 zawierających domenę Y (ang. *Y-box binding protein*) oraz czynnika jądrowego NF-Y (ang. *Nuclear factor Y*). Promotor genu zwiera także wyspy bogate w sekwencje GC (fragment od -56 do -43), które oddziałują z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny Sp. Wśród czynników transkrypcyjnych biorących udział w regulacji ekspresji genu *ABCB1* wyróżnia się białko odpowiedzi wczesnego wzrostu EGR1 (ang. *Early growth response factor-1*), jądrowy czynnik dla interleukiny 6 NF-IL6 (ang. *Factor for interleukin -6*), jądrowy czynnik dla NF-R2 (ang. *Nuclear factor-erythroid 2-related factor*), receptor dla steroidów i ksenobiotyków SXR/PXR (ang. *Steroid and Xenobiotic receptor*) a także insulinę, naskórkowy czynnik wzrostu EGF, czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF alfa), białko szoku cieplnego HSP (ang. *Heat shock proteins*). (120) Niektóre substancje będące substratami glikoproteiny P mogą także indukować ekspresję genu *ABCB1* np. digoksyna, rifampicyna, cis-platyna czy doksorubicyna.

1.5.3. Znaczenie polimorfizmów w genie *ABCB1* dla funkcjonowania transportera

Polimorfizmy genu *ABCB1* mogą regulować poziom ekspresji genu i w efekcie powodować wzrost lub spadek ilości białka *ABCB1*. Możliwe jest także, że zmiana w strukturze białka będąca efektem polimorfizmu może wpłynąć na większe bądź mniejsze powinowactwo substratów i tym samym zmianę aktywności białka. W konsekwencji, z jednej strony może dojść do kumulacji ksenobiotyków w komórce i transformacji nowotworowej a z drugiej strony do zmiany w farmakokinetyce leków w związku z ich nadmiernym usuwaniem z komórki.

Spośród szeregu polimorfizmów występujących w obrębie genu *ABCB1* największą uwagę skupiają dwa: zamiana cytozyny na tyminę w pozycji 3435 (3435 C/T, rs1045642) oraz zamiana guaniny na tyminę bądź adeninę w pozycji 2677 (2677 G/A,T, rs2032582).

Polimorfizm 3435 C/T jest to zmiana synonimiczna zlokalizowana się w egzonie 26 genu *ABCB1*. Wariant ten koduje aminokwas izoleucynę w pozycji 1145 glikoproteiny p, w miejscu obejmującym domenę NBD odpowiedzialną za wiązanie ATP. (113) Częstość występowania formy polimorficznej jest zależna od populacji i u rasy kaukaskiej wynosi 36-63% (121) w tym w populacji polskiej 55-63% (122–124). W populacji japońskiej natomiast allel ten występuje częściej t.j. u 58-69% badanych a w populacji zachodnioafrykańskiej aż u 90% osób, co jest zaskakujące ze względu na fakt występowania allelu C populacyjnie częściej i w związku z tym uznania go jako allele dziki (121). Natomiast w populacji indyjskiej częstość allelu T wynosi 33%, a wśród populacji południowo amerykańskiej częstość formy polimorficznej wynosi 30-70%. (120)

Konsekwencją polimorfizmu 3435 C/T nie jest zmiana aminokwasowa ale możliwe jest, że jego obecność zmienia strukturę bądź aktywność białka. Obecność allelu T w pozycji 3435 genu *ABCB1* może wpływać na zmianę w procesie składania mRNA (ang. *splicing*), fałdowania białka czy modyfikacji potranslacyjnych. (125) Wykazano, że z jednej strony obecność formy polimorficznej TT koreluje z niższym poziomem Pgp w łożysku, wątrobie i leukocytach natomiast zależności tej nie wykazano oceniając poziom Pgp w wątrobie, sercu i jelicie grubym. Zaobserwowano natomiast korelację pomiędzy występowaniem allelu polimorficznego T a dwukrotnym spadkiem ilości Pgp w jelicie cienkim. (121) Możliwe jest zatem, że obecność poszczególnych alleli może korelować z kumulacją ksenobiotyków w komórce i tym samym z wystąpieniem szeregu chorób m.in raka piersi (126–128)

Jednakże ze względu na heterogenność badanych grup trudno jest określić bezpośrednią zależność pomiędzy polimorfizmem a strukturą/aktywnością białka *ABCB1* i w efekcie jego wpływu na wzrost zachorowania. Natomiast badania na komórkach raka szyjki macicy HeLa wykazały, że polimorfizm 3435 C/T powoduje zmianę konformacji we fragmencie białka odpowiedzialnego za wiązanie substratu, jednocześnie nie zmieniając poziomu ekspresji genu *ABCB1*. (121)

Z kolei polimorfizm 2677 G/T,A jest polimorfizmem trzyallelowym gdzie zamianie ulega guanina w tyminę bądź adeninę. W efekcie dochodzi do zmian aminokwasowych w sekwencji białka: zmiana alaniny na serynę (wariant T) bądź treoninę (wariant A) w pozycji 893 białka obejmującego transbłonową domenę TMD. Zmiany aminokwasowe w pozycjach zbliżonych do omawianej: G830V i I849M powodują zmiany w aktywności ATP-azowej indukowanej lekami a konserwatywna mutacja w pozycji P866 powoduje zmniejszenie wydajności transportu adriamycyny i aktynomycyny D z komórki. Możliwe jest zatem, że polimorfizm 2677G/T,A, którego efektem jest zmiana aminokwasu w pozycji 893

może także modulować aktywność białka. (129) Jak wykazano, obecność formy polimorficznej 2677 TT z jednej strony zwiększa funkcję transportową Pgp (130) z drugiej strony obserwuje się spadek aktywności białka.

Mimo rozbieżności wyników badań dotyczących znaczenia polimorfizmów 3435 C/T oraz 2677 G/T,A w patogenezie oraz leczeniu chorób szereg badań wskazuje, że współwystępowanie obydwu polimorfizmów może mieć wartość diagnostyczną oraz prognostyczną. Wykazano, że haplotyp 2677GG/3435TT koreluje ze znacząco wyższą biodostępnością podanej doustnie digoksyny, podczas gdy forma dzika 2677GG/3435CC powoduje obniżoną biodostępność leku. (130). Możliwe więc, że kumulacja ksenobiotyków w komórce przyczynia się do inicjacji procesu chorobowego. Zaobserwowano zależność pomiędzy współwystępowaniem form polimorficznych 2677TT/3435TT a zwiększoną zapadalnością na chorobę Parkinsona, Crohna, raka nerki czy ryzyko zakażenia wirusem HIV. Wykazano także zależność pomiędzy obecnością tych polimorfizmów a opornością na leczenie w chorobie Crohna i nowotworze odbytnicy. (131) Z drugiej jednak strony Borecki i wsp. nie wykazali zależności pomiędzy omawianymi polimorfizmami genu *ABCB1* a zachorowalnością na chorobę Crohna w populacji polskiej i bośniackiej. (132) Uważa się także, że występowanie wariantów 2677TT oraz 3434TT, poprzez zwiększone wydzielanie toksyn do moczu w kanaliku bliższym nerki, działa ochronnie na funkcję nerki. (133)

1.5.4. Znaczenie polimorfizmów *ABCB1* w patogenezie i leczeniu raka piersi

Postuluje się, że polimorfizmy genu *ABCB1* mogą korelować z zachorowaniem na raka piersi a także z dostępnością leków i tym samym efektywnością leczenia. Jak już wspomniano, komórki nowotworowe charakteryzują się wyższym, w stosunku do komórek prawidłowych, poziomem białka *ABCB1*. Jednakże, zaobserwowano, że ilość białka *ABCB1* w komórkach raka piersi może być zależna od polimorfizmów genu *ABCB1*. Wykazano, że u pacjentek będących homozygotami dzikimi 3435 CC poziom ekspresji *ABCB1* w komórkach raka piersi był znacząco niższy niż w komórkach nowotworowych homozygot polimorficznych TT. (134) Ponadto u kobiet w wieku przedmenopauzalnym obecność allelu T polimorfizmu 3435C/T koreluje z 2-krotnie większym ryzykiem zachorowania na raka piersi i jednocześnie koreluje z brakiem receptorów estrogenowych na powierzchni komórek nowotworowych. (135) Uważa się także, że polimorfizm ten nie tylko koreluje ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi ale także z osłabioną odpowiedzią na leczenie.

Badania wskazują, że kobiety chorujące na lokalnie zaawansowanego raka piersi i zidentyfikowane jako homozygoty polimorficzne 3435 TT, gorzej odpowiadają na leczenie raka piersi (136,137) m.in. na terapię antracyklinami będącymi w spektrum substratowym białka ABCB1 (138). Z drugiej jednak strony u pacjentek będących homozygotami polimorficznymi TT, u których zastosowano przedoperacyjne leczenie antracyklinami, uzyskano efekt kliniczny w postaci zmniejszenia się guza pierwotnego i braku przerzutów. Natomiast u kobiet opisanych jako heterozygoty 3435 C/T przy zastosowaniu takiego samego schematu leczenia nie zaobserwowano zadowalających efektów terapeutycznych. (139) Możliwe zatem, że obecność allelu T zmniejsza aktywność glikoproteiny P, w efekcie czego dochodzi do kumulacji leku w komórce, wzrostu efektu działania i tym samym wydłużenia czasu wolnego od choroby i całkowitego czasu życia pacjentek. (140) Uważa się także, że kumulacja leku w komórce wynikająca ze zmniejszonej ekspresji *ABCB1* nie tylko sprzyja zwiększeniu efektywności leczenia ale także ma niekorzystne działanie. Wykazano, że stężenie docetakselu po dożylnym podaniu leku jest znacząco wyższe u homozygot polimorficznych TT co w konsekwencji powoduje większą efektywność leczenia ale także wzrost częstości występowania efektów ubocznych leczenia tj. neutropenii, wymiotów, gorączki i zapalenia żołądka. (140) Jednakże szereg badań wskazuje na brak zależności pomiędzy obecnością polimorfizmu 3435 C/T a efektywnością chemioterapii w raku piersi. (126,141) Może zatem należy uwzględnić szerszą charakterystykę komórek nowotworowych gdyż jak się wydaje może istnieć zależność pomiędzy polimorfizmem 3435 C/T, receptorami estrogenowymi, progesteronowymi i receptorami dla naskórkowego czynnika wzrostu a całkowitym czasem przeżycia pacjentek. Kobiety będące homozygotami polimorficznymi 3435 TT i jednocześnie nie posiadające receptorów ER, PgR i HER2 istotnie statystycznie dłużej żyły oraz miały dłuższy czas wolny od wznowy (138) choć jednocześnie wzrastało prawdopodobieństwo wystąpienia zapalenia błony śluzowej jamy ustnej jako ubocznego efektu leczenia everolimusem (142).

Podobne rozbieżności zaobserwowano analizując polimorfizm 2677 G/T,A. Chang i wsp wykazali zależność pomiędzy obecnością formy dzikiej 2677G/G a opornością na leczenie paklitakselem i antracyklinami. (127) Z drugiej jednak strony badania wskazują, że polimorfizm ten nie wpływa na odpowiedź na terapię przeciwnowotworową ale może korelować z wystąpieniem efektów ubocznych chemioterapii ponieważ u kobiet będących homozygotami dzikimi 2677 G/G istotnie statystycznie częściej obserwuje się gorączkę i neutropenię podczas stosowania docetakselu, epirubicyny i cyklofosfamidu. (143) Ponadto obecność rzadko występującego allelu A koreluje z szybszym nawrotem choroby

nowotworowej oraz krótszym czasem przeżycia kobiet leczonych dokсорubicyną i cyklofosfamidem. (144)

Rozbieżności w wynikach badań dotyczące udziału polimorfizmów 3435C/T i 2677G/A,T genu *ABCB1* mogą wynikać z jednej strony z dużej heterogenności grupy badanej ale także ze sprzężenia zwrotnego związanego z wpływem substratów białka ABCB1 (np. dokсорubicyny, rifampicyny) na ekspresję genu *ABCB1*. Pod wpływem ekspozycji np. na dokсорubicynę ilość białka ABC1 wzrasta, co przekłada się na większą zdolność do usuwania substratu przez białko i tym samym spadku ilości dokсорubicyny, spadku ilości białka i w konsekwencji zmiennej efektywności leczenia.

2. Cel pracy

Jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój raka piersi są mutacje/polimorfizmy szeregu genów, których identyfikacja pozwoliła na uznanie ich jako markery nowotworzenia. Wydaje się, że polimorfizmy genów *LEP* i *LEPR* uczestniczące w regulacji masy ciała czy polimorfizmy genu *ABCB1*, kodującego białko ABCB1 odpowiedzialne za usuwanie ksenobiotyków z komórki mogą także stać się markerami prognostycznymi raka piersi.

Ponadto oporność nowotworów na terapię to niewątpliwie jedna z głównych przyczyn niepowodzeń w leczeniu przeciwnowotworowym. Zatem ocena udziału molekularnych czynników w regulacji aktywności i ilości białka ABCB1 może stać się ważnym elementem w doborze terapii przeciwnowotworowej.

W związku z powyższym celem niniejszej pracy była ocena przydatności identyfikacji polimorfizmów *ABCB1*, *LEP* i *LEPR* jako potencjalnych markerów diagnostycznych i predykcyjnych w raku piersi.

Szczegółowe cele pracy to analiza molekularna w zakresie:

- częstości występowania polimorfizmów genów *LEP*, *LEPR* i *ABCB1* w grupie kobiet zdrowych oraz ze zdiagnozowanym rakiem piersi w województwie wielkopolskim
- analizy zależności pomiędzy występowaniem polimorfizmów a rakiem piersi
- określenia częstości występowania różnych typów nowotworów wśród kobiet z rakiem piersi z rejonu województwa wielkopolskiego
- oceny zależności pomiędzy obecnością polimorfizmów badanych genów a stopniem zaawansowania choroby nowotworowej wyrażonym wielkością guza, obecnością przerzutów oraz ekspresją receptorów estrogenowych, progesteronowych i naskórkowego czynnika wzrostu
- analizy *in vitro* zależności pomiędzy polimorfizmami genu *ABCB1*, poziomem i aktywnością białka ABCB1 a odpowiedzią komórek raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231 na działanie doksorubicyny

3. Odczynniki, materiały, metody

3.1. Podłoża, bufor, enzymy, odczynniki

3.1.1. Podłoża:

Wzrostowe: RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) + 10% FBS Superior (Biochrom)

Do mrożenia: 95% RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) + 5% DMSO (Sigma-Aldrich)

3.1.2. Bufory:

Bufor do lizy białek RIPA, pH 7,4:

0,1% SDS (POCH)

1% deoksyholan sodu (Merck)

1% TRITON X-100 (Sigma-Aldrich)

5 mM EDTA (POCH)

150 mM NaCl (POCH)

50 mM Tris (BioShop)

25 µg/ml aprotynina (Sigma-Aldrich)

25 µg/ml leupeptyna (Sigma-Aldrich)

5 mM NaF (Sigma-Aldrich)

5mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich)

1mM PMSF (Sigma-Aldrich)

Bufor do elektroforezy białek, pH 8,3:

25 mM Tris (BioShop)

192 mM glicyna (BioShop)

0,1% SDS (BioShop)

Bufor do transferu, pH 8,1:

25 mM Tris (BioShop)

192 mM Glicyna (BioShop)

Bufor TBS, pH 8,0:

10 mM Tris (BioShop)

150 mM NaCl (BioShop)

Bufor TBST, pH 7,5:
50 mM Tris (BioShop)
150 mM NaCl (BioShop)
0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich)

Buforowana fosforanem sól fizjologiczna (PBS), pH 7,4:
140 mM NaCl (POCH)
2,7 mM KCl (POCH)
4,6 mM Na₂HPO₄ (POCH)
1,7 mM NaH₂PO₄ (POCH)

Bufor TBE do elektroforezy DNA (10x stężony)
108 g Tris (pH 8.3) (BioShop)
55 g kwas borny (POCH)
40 ml 0,5 M EDTA (pH 8) (Sigma-Aldrich)

3.1.3. Enzymy:

Polimeraza Taq (Sigma-Aldrich)
Enzym restrykcyjny SauIIA1 (Sigma-Aldrich)
Enzym restrykcyjny HaeIII (Sigma-Aldrich)
Enzym restrykcyjny MspI (Sigma-Aldrich)
Enzym restrykcyjny CfoI (Sigma-Aldrich)
Proteinaza K (Sigma-Aldrich)
Trypsyna 0.25% - EDTA w HBSS z czerwienią fenolową (Biowest)

3.1.4. Odczynniki:

Agaroza BASICA LE (ABO)
Albumina surowicy wołowej (BSA)(Sigma-Aldrich)
Beta-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)
Bufor obciążający do elektroforezy agarozowej (A&A Biotechnology)
Dimetylosulfotlenek (Sigma-Aldrich)
Doksorubicyna (Sigma-Aldrich)
EDTA (Sigma-Aldrich)

Etanol (POCH)
Film CL-X Posure™ (Thermo Scientific)
Filtr PVDF (Thermo Scientific)
HCL (POCH)
Izopropanol (Avantor)
Metanol (Avantor)
Midori Green Advance DNA Stain (ABO)
MTT (Sigma-Aldrich)
Odczynnik Bradford (BioShop)
Odtłuszczone mleko w proszku (SM Mlekovita)
PI (Sigma-Aldrich)
Rodamina 123 (Sigma-Aldrich)
SDS (Bioshop)
Spirytus skażony hibitanem (Cefarm Poznań)
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrat (Thermo Scientific)
TEMED Tetrametyloetylendiamina (Sigma-Aldrich)
Wzorzec masy białek PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)
Wzorzec wielkości DNA FastRuler™ DNA Ladder, Middle range (Thermo Scientific)
Zestaw do izolacji DNA (A&A Biotechnology)
Zestaw do oczyszczania DNA Novabeads Blood Genomic DNA KIT (Novazym Polska).

Doksorubicyna - charakterystyka

Obecność mutacji/polimorfizmów w obrębie DNA komórek nowotworowych może przyczynić się do wzrostu bądź zmniejszenia wrażliwości tych komórek na działanie chemioterapeutyków. W związku z tym postanowiono ocenić udział badanych polimorfizmów w odpowiedzi komórek linii raka piersi MCF7 i MDA-MB-231 na działanie jednego z chemioterapeutyków stosowanego w leczeniu raka piersi – doksorubicyny.

Doksorubicyna jest lekiem o działaniu przeciwnowotworowym z grupy antracyklin stosowanym do leczenia m.in. raka piersi, jajnika, tarczycy, pęcherza moczowego, płuca czy różnych typów białaczek. Związek ten wyizolowano w 1971r. z hodowli *Streptomyces peuceticus var. caesius*. i wykazano, że poprzez wbudowywanie się w dwuniciową strukturę DNA hamuje replikację w następstwie czego dochodzi do zatrzymania podziałów komórkowych. Doksorubicyna zmniejsza również aktywność topoizomerazy II, polimeraz RNA i DNA, helikaz oraz enzymów naprawczych DNA a także indukuje uszkodzenia DNA. Warto przypomnieć, że lek ten jest wydalany z komórki m.in. poprzez przezbłonową pompę – ABCB1.

Do oceny wpływu doksorubicyny na wybrane linie komórkowe raka piersi wykorzystano wodny roztwór chlorowodoru doksorubicyny (Sigma–Aldrich), który do czasu analizy przechowywany był w temperaturze -20°C . Odpowiednie rozcieńczenia związku wykorzystywane do traktowania komórek nowotworowych przygotowano bezpośrednio przed wykonaniem analizy. Aby uniknąć wpływu rozpuszczalnika na proliferację komórek do rozcieńczania doksorubicyny wykorzystano pożywkę hodowlaną.

3.2. Stosowane metody

3.2.1. Izolacja DNA

Materiał do analizy obecności polimorfizmów w genach *ABCBI*, *LEP* i *LEPR* stanowił genomowy DNA wyizolowany z leukocytów krwi obwodowej pobranej na wersenian disodowy (EDTA). Krew pobrano według standardowych procedur a izolację przeprowadzano metodą kolumnkową przy użyciu zestawu do izolacji DNA (A&A Biotechnology), zgodnie z instrukcją producenta. Zasada metody izolacji DNA z wykorzystaniem złoż krzemionkowych opiera się na wiązaniu DNA uwolnionego z komórek ze złożem krzemionkowym w obecności wysokich stężeń soli chaotropowych. W takich warunkach ujemnie naładowane cząsteczki DNA łączą się z dodatnio naładowanymi cząsteczkami krzemionki dzięki czemu możliwe jest usunięcie niezwiązanych ze złożem zanieczyszczeń tj. białek, błon komórkowych, RNA itd.

Przed przystąpieniem do izolacji krew dokładnie wymieszano na mieszadle rolkowym a następnie przeniesiono 100µL krwi do 1,5 ml probówki typu Eppendorf. Do probówki dodano 200µL buforu lizującego LT oraz, w celu zahamowania aktywności endogennych DNAz oraz degradacji białek związanych z DNA, 20µL proteiny K. Całość wymieszano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 min. Następnie próbkę intensywnie mieszano przez 20s i całość mieszaniny naniesiono na kolumnę zawierającą złoż krzemionkowe. Próbkę wirowano (10-15tys. obr./min) przez 1 min w temperaturze pokojowej a następnie kolumnę przeniesiono do nowej probówki zbiorczej i dwukrotnie przepłukano złożem roztworem płuczającym A1 w celu usunięcia zanieczyszczeń. Osuszoną kolumnę umieszczono w nowej probówce 1,5 ml, dodano 100µL buforu Tris i inkubowano 5min. w temperaturze pokojowej. Kolumnę wirowano 1 min (10-15tys. obr./min, RT) a w uzyskanym przesączu oznaczano ilość i czystość izolowanego DNA, który przechowywano w lodówce lub w temperaturze -20°C celem prowadzenia dalszych analiz.

3.2.2. Ocena jakościowa i ilościowa DNA

Ocena jakościowa

Ocenę jakościową wyizolowanego DNA przeprowadzono za pomocą elektroforezy w 0,8% żelu agarozowym. 100ml żelu agarozowego uzyskano poprzez rozpuszczenie 0,8 grama agarozy w 100ml buforu TBE (Tris, Kwas borny, EDTA). Następnie mieszaninę podgrzano do rozpuszczenia się agarozy, przestudzono i wylano na saneczki do elektroforezy pozostawiając do usieciowania. W tak przygotowany żel naniesiono 5 μ l wyizolowanego DNA i prowadzono elektroforezę przez 3 godziny przy napięciu 120V (zestaw do elektroforezy Kucharczyk). Po zakończonej elektroforezie żel wybarwiono bromkiem etydyny

i obserwowano przy długości fali $\lambda=495\text{nm}$ za pomocą zestawu UV Vis System EpiChem3 Darkroom (UVP Inc., Upland) i programowi LabWorks 4.6.

Ocena ilościowa

Stężenie wyizolowanego DNA zmierzono za pomocą zestawu do spektrofotometrycznych pomiarów DNA firmy Eppendorf (Eppendorf Biophotometr plus). Na mikrokuwetę naniesiono 1 μ l zawiesiny DNA i mierzono przy długościach fali $\lambda=260\text{ nm}$ i $\lambda=280\text{ nm}$ dzięki czemu obliczono stopień zanieczyszczenia DNA białkami, który wyrażony jest stosunkiem absorbancji próby przy długości fali $\lambda=260\text{ nm}$ i absorbancji przy długości fali $\lambda=280$. Proporcja ta w przypadku DNA o wysokiej czystości mieści się w zakresie 1,8-2,0. Natomiast wartość wykraczająca poza te ramy świadczy o zanieczyszczeniu próby i wymagają przeprowadzenia procedury oczyszczania.

3.2.3. Oczyszczanie DNA

Próby DNA w których stosunek absorbancji przy długości fali $\lambda=260\text{ nm}$ i $\lambda=280\text{ nm}$ wykraczał poza zakres 1,8-2,0, co świadczyło o obecności zanieczyszczeń, zostały oczyszczone za pomocą zestawu Novabeads Blood Genomic DNA KIT (Novazym Polska). Zasada metody opiera się na wykorzystaniu kompozytowego złoża magnetycznego, które selektywnie wiąże kwasy nukleinowe. Dzięki zastosowaniu odpowiednich buforów wiążących DNA do cząstek magnetycznych możliwe jest efektywne płukanie i uzyskanie DNA o wysokiej czystości.

Przed przystąpieniem do procedury oczyszczania zawiesinę DNA dokładnie wymieszano a odczynniki wykorzystywane do oczyszczania ogrzano do temperatury pokojowej. Następnie do 100µl zawiesiny DNA dodano 150µl buforu do lizy i 50µl cząsteczek magnetycznych, które uprzednio dokładnie wymieszano. Zawartość probówki wymieszano a następnie inkubowano przez 5min. w temperaturze 25⁰C co umożliwiło związanie się cząsteczek magnetycznych z kwasami nukleinowymi. W kolejnym etapie probówkę umieszczono w statywie magnetycznym i odczekano do momentu kiedy wszystkie cząstki zbiorą się przy ścianie probówki sąsiadującej z magnezem. Z umieszczonych w statywie magnetycznych probówek zlano nadsącz i wstępnie przepłukano za pomocą 1ml buforu. Probówki wyjęto ze statywu, mieszano intensywnie 5 sekund i ponownie wstawiono do statywu magnetycznego. Nadsącz zlano, dodano 1ml buforu płuczącego i mieszano intensywnie przez 5 sekund. Następnie w celu dokładnego odpłukania zanieczyszczeń mieszaninę inkubowano przez 5 min w temperaturze 25⁰C i ponownie wstawiono do statywu magnetycznego. Po usunięciu nadsączu dodano 1ml 70% izopropanolu, wymieszano intensywnie przez 5 sekund i rozdzielono magnetycznie. Izopropanol zlano a cząsteczki magnetyczne przepłukano za pomocą 1 ml buforu TE (Tris, EDTA). Następnie, w celu uwolnienia DNA z cząstek magnetycznych dodano 100µl buforu TE i inkubowano przez 10 min w temperaturze 60⁰C cały czas mieszając. Po zakończeniu inkubacji przy użyciu statywu magnetycznego oddzielono nadsącz zawierający DNA od cząsteczek magnetycznych i przeniesiono do nowej probówki 1,5 ml. Oczyszczone DNA przechowywano w lodówce lub w temp. -20⁰C celem dalszych analiz.

3.2.4. Analiza PCR-RFLP

Obecność polimorfizmów genów: *ABCBI* 3435C/T, *LEP* 2548G/A, *LEPR* 109Lys/Arg, 223Gln/Arg oceniano wykorzystując analizę długości fragmentów restrykcyjnych RFLP (ang. *restriction fragments length polymorphism*). Metoda ta polega na trawieniu enzymem restrykcyjnym uprzednio powielonego za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazowej PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) fragmentu DNA obejmującego polimorficzny locus. Wysoką czułość oraz specyficzność reakcji PCR zapewniają odpowiednio dobrane, specyficzne względem badanego genu startery (Tabela 4) trifosforany deoksyrybnukleotydów (dNTPs), bufor reakcyjny, jony Mg²⁺ oraz polimeraza Taq.

Tabela 3 Sekwencje starterów, temperatura ich przyłączenia, długość produktów oraz procentowość żelu konieczna do analizy polimorfizmów genów *ABCB1*, *LEP* i *LEPR*.

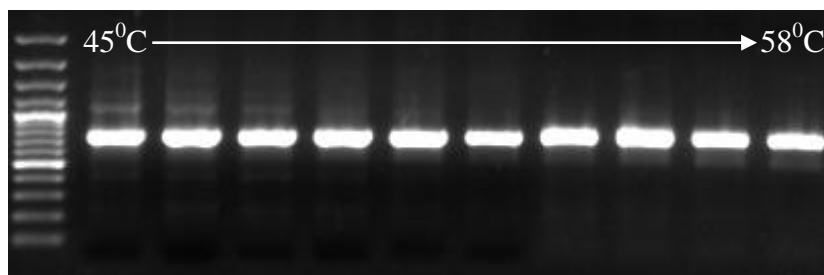
Startery	Sekwencje starterów	Temp. wiązania starterów [°C]	Długość produktu [pz]	Żel agarozowy [%]
ABCB1-F ABCB1-R	5'-TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG-3' 5'-AAGGCATGTATGTTGGCCTC-3'	59	197	2
LEP-F LEP-R	5'-TTTCTGTAATTTCCCGTGAG-3' 5'-AAAGCAAAGACAGGCATAAAAA-3'	53	242	1,5
LEPR 109Lys/ArgF LEPR 109Lys/ArgR	5'-TTTCCACTGTTGCTTTCGGA-3' 5'-AAACTAAAGAATTTACTGTTTGAAACAAATGGC-3'	55	101	3
LEPR 223Gln/ArgF LEPR 223Gln/ArgR	5'-AAACTCAACGACTCTCCTT-3' 5'-TGAAGTACATTAGAGGTGAC-3'	59	80	3

Startery zastosowane do reakcji PCR zostały zaprojektowane za pomocą programu Primer 3 (145) a temperatura wiązania starterów została wyznaczona eksperymentalnie. F – ang. *forward*, starter przedni; R – ang. *reverse*, starter tylny; pz – par zasad.

Poszczególne składniki mieszaniny reakcyjnej umieszczono w lodzie, wymieszano i dodano w odpowiednich ilościach do próbki do objętości końcowej 25µl (Tabela 4). Następnie dodano 1µl DNA, próby krótko wirowano, tak aby cała zawartość mieszaniny znajdowała się na dnie próbki. Tak przygotowane próby umieszczono w termocyklerze, który umożliwia przeprowadzenie reakcji w cyklicznie powtarzających się etapach.

- denaturacja wstępna – 5 min. 94⁰C
 - denaturacja – 40 sek. 94⁰C
 - przyłączenie starterów – 40 sek. X⁰C*
 - wydłużanie – 40 sek. 72⁰C
 - wydłużanie końcowe – 7 min. 72⁰C
- } powtarzane cyklicznie 35 razy

*Temperaturę przyłączenia starterów wyznaczano eksperymentalnie wykonując reakcję PCR w gradiencie temperatury a następnie elektroforetyczny rozdział produktów w żelu agarozowym. Procentowość żelu agarozowego została dobrana odpowiednio do długości produktów reakcji PCR (Tabela 4). Po przeprowadzonej elektroforezie żel wybarwiono bromkiem etydyny i obserwowano przy długości fali $\lambda=495\text{nm}$. (Rycina 7) Po zoptymalizowaniu warunków amplifikacji reakcję PCR przeprowadzano w objętości 25µl (Tabela 4).



Rycina 7. Elektroforetyczny rozdział produktu reakcji PCR w gradiencie temperatury.

Przedstawiony rozdział elektroforetyczny obrazuje produkt reakcji PCR w gradiencie temperatury z wykorzystaniem satarterów specyficznych względem polimorfizmu 2548G/A genu *LEP*. Uzyskano produkty o długości 242 pz. Reakcję prowadzono w zakresie temperatury 45⁰C-58⁰C.

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

Składnik	Stężenie/ilość	Objętość [ul]
Matryca DNA	50ng	1
Polimeraza Taq	5U/μl	0,2
dNTPs	25mM	1
F	25μM	0,5
R	25μM	0,5
Bufor Mg ²⁺	25mM	2,5
Woda dejonizowana	-	19,3
Objętość końcowa		25

Skład mieszaniny został zoptymalizowany dla analizy polimorfizmów genów *ABCBI* 3435 C/T, *LEP* 2548G/A i *LEPR* 223Gln/Arg oraz 109Lys/Arg. F, R; odpowiednio starter przedni i tylny, dNTPs – mieszanina deoksynukleotydów

Aby ocenić prawidłowość przebiegu reakcji PCR równolegle z próbami badanymi dokonywano analizy kontroli negatywnej, która nie zawierała matrycy DNA. Po zakończonej reakcji PCR próby przechowywano w temperaturze 4⁰C celem przeprowadzenia oceny jakościowej w żelu agarozowym oraz analizy restrykcyjnej.

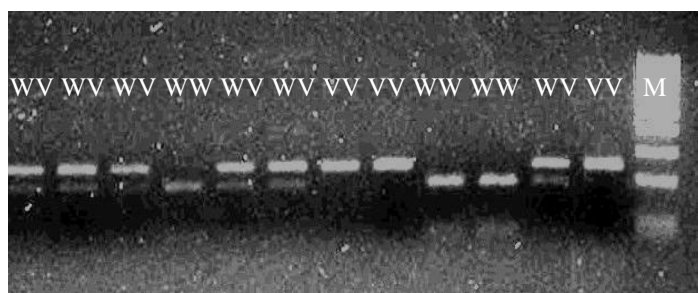
Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych RFLP to metoda, która wykorzystuje zdolność enzymu restrykcyjnego do rozpoznawania i rozcinania specyficznej, charakterystycznej dla danego enzymu dwuniciowej sekwencji DNA. W wyniku trawienia powstają krótsze fragmenty, możliwe do identyfikacji w żelu agarozowym.

Tabela 5. Enzymy restrykcyjne oraz długość produktów trawienia enzymami wykorzystywanymi w analizie polimorfizmów genów *ABCB1* oraz *LEP* i *LEPR*

Polimorfizm	Enzym restrykcyjny	Produkt [pz]	Żel agarozowy [%]
<i>ABCB1</i> 3435 C/T	SauIIIAI	158; 38	3
<i>LEP</i> 2548G/A	CfoI	181; 61	2
<i>LEPR</i> 109	HaeIII	70; 31	4
<i>LEPR</i> 223	MspI	58; 22	4

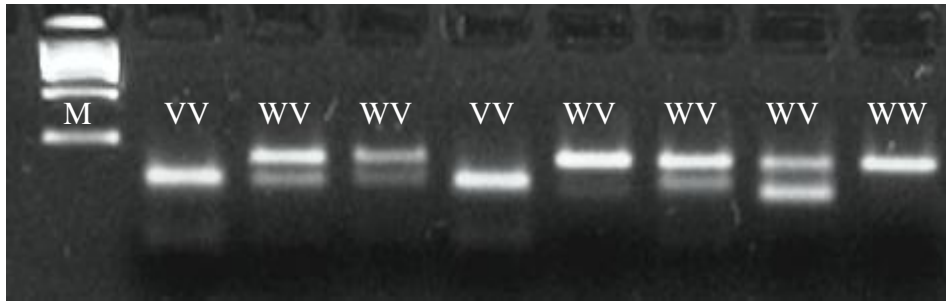
Reakcję PCR-RFLP prowadzono w objętości 25µl a skład mieszaniny reakcyjnej zawierał: produkt reakcji PCR (18µl), bufor (2,5µl), woda dejonizowana (4,4µl), enzym restrykcyjny odpowiedni dla poszczególnych polimorfizmów (0,1µl/1U) (Tabela 5)

Trawienie enzymem restrykcyjnym prowadzono w temperaturze 37⁰C przez 1 godzinę a produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie (1,5h, 80V) w żelu agarozowym. Procentowość żelu agarozowego została dobrana odpowiednio do długości powstałych produktów trawienia enzymem restrykcyjnym (Tabela 5). Po zakończonej elektroforezie żel wybarwiono bromkiem etydydy i obserwowano przy długości fali λ=495nm (Rycina 8-11). W celu oceny wielkości produktu reakcji w żel naniesiono także 5µl markera wielkości.



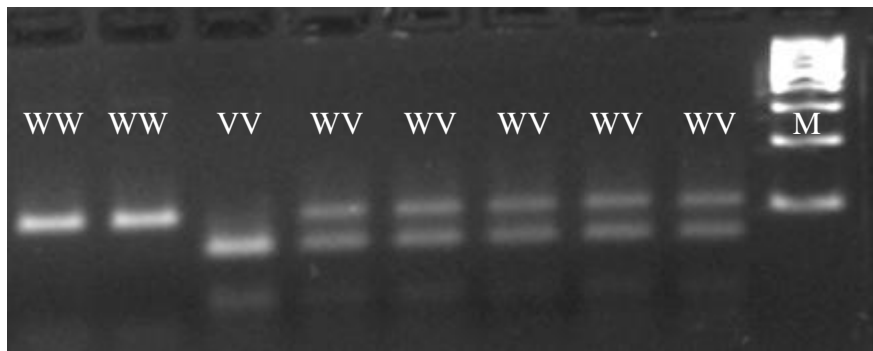
Rycina 8. Elektroforetyczny rozdział produktów trawienia ampikonów enzymem restrykcyjnym CfoI w 2% żelu agarozowym.

Enzym CfoI rozpoznaje sekwencję dziką GG polimorfizmu 2548 G/A genu *LEP*. WW – homozygota GG; WV – heterozygota GA; VV – homozygota polimorficzna AA; M – marker wielkości. (Typowy obraz rozdziału elektroforetycznego).



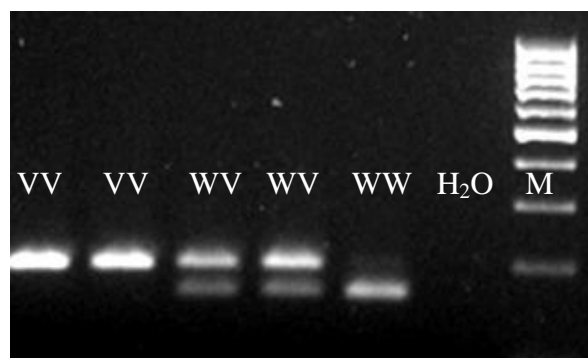
Rycina 9. Elektroforyczny rozdział produktów trawienia ampikonów enzymem restrykcyjnym MspI w 4% żelu agarozowym.

Enzym MspI rozpoznaje miejsce polimorficzne polimorfizmu rs1137101 (223Gln/Arg) genu *LEPR*. WW – homozygota dzika Gln/Gln; WV– heterozygota Gln/Arg; VV – homozygota polimorficzna Arg/Arg, M – marker wielkości. (Typowy obraz rozdziału elektroforetycznego).



Rycina 10. Elektroforyczny rozdział produktów trawienia ampikonów enzymem restrykcyjnym HaeIII w 4% żelu agarozowym.

Enzym Hae III rozpoznaje sekwencję polimorficzną Arg/Arg rs1137100 (109Lys/Arg) genu *LEPR*. WW – homozygota dzika Lys/Lys; WV– heterozygota Lys /Arg; VV – homozygota polimorficzna Arg/Arg. (Typowy obraz rozdziału elektroforetycznego).



Rycina 11. Elektroforyczny rozdział produktów trawienia ampikonów enzymem restrykcyjnym SauIII A1 w 3% żelu agarozowym.

Enzym SauIII A1 rozpoznaje sekwencję dziką CC polimorfizmu 3435 C/T genu *ABCBI*. WW – homozygota dzika CC; WV – heterozygota CT; VV – homozygota polimorficzna TT; H₂O – próba negatywna niezawierająca DNA; M – marker wielkości. (Typowy obraz rozdziału elektroforetycznego).

3.2.5. PCR-ASA

Polimorfizm G2677A/T genu *ABCB1* jest polimorfizmem tryallelowym co oznacza że allel dziki G może zostać zastąpiony allelem A lub T. W związku z czym jako metodę do określania genotypu wykorzystano reakcję PCR specyficzną względem allelu - PCR-ASA (ang. *allele-specific amplification*). W metodzie tej stosowano 5 starterów: komplementarny względem sekwencji zawierającej allel dziki (FG), komplementarne względem alleli polimorficznych (FA lub FT), starter odwrotny (RR) a także, dla zweryfikowania amplifikacji DNA przy braku badanego allelu, starter kontrolny (FK) (Tabela 6). Dla każdej próbki przeprowadzano trzy niezależne reakcje wykorzystując poszczególne startery. Reakcję przeprowadzono w objętości 20 μ L (Tabela 7).

Tabela 6. Sekwencje starterów, temperatura ich przyłączenia, długość produktów oraz procentowość żelu konieczna do analizy polimorfizmu 2677G/A,T genu *ABCB1*.

Startery	Sekwencje starterów	Temp. wiązania starterów [°C]	Długość produktu [pz]	Żel agarozowy [%]
FA	5'-TGA AAG ATA AGA AAG AAC TAG AAG GTA-3'	56	222	2
FT	5'-TGA AAG ATA AGA AAG AAC TAG AAG GTT-3'	56	222	2
FG	5'-TGA AAG ATA AGA AAG AAC TAG AAG GTG-3'	56	222	2
FK	5'-AGC AAA TCT TGG GAC AGG AA-3'	57	353	2
RR	5'-AGT CCA AGA ACT GGC TTT GC-3'	56	222/353	2

Startery zastosowane do reakcji PCR zostały zaprojektowane za pomocą programu Primer 3 (145) a temperatura wiązania starterów została wyznaczona eksperymentalnie F – ang. *forward*, starter przedni; R – ang. *reverse*, starter tylny, K- kontrola, pz –par zasad

Podczas jednej analizy przygotowywano trzy mieszaniny reakcyjne – każda mieszanina zawierała startery dla innego allelu, starter tylny (RR) oraz starter kontrolny (FK), wodę, bufor, mieszaninę oligonukleotydów oraz polimerazę.

Tabela 7 . Skład mieszaniny reakcyjnej PCR-ASA

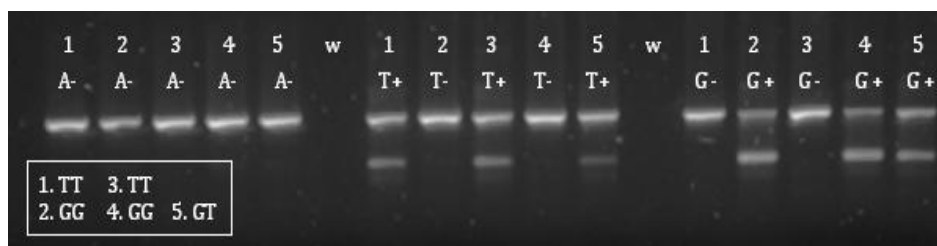
Składnik	Stężenie/ilość	Objętość [μl]
Matryca DNA	50ng	1
Polimeraza Taq	5U/μl	0,2
dNTPs	25mM	1,6
FA, FT, FG	25μM	0,4
RR	25μM	0,56
FK	25μM	0,16
Bufor Mg ²⁺	11mM	2,0
Woda dejonizowana	-	19,08
Objętość końcowa		25

Skład mieszaniny został zoptymalizowany dla analizy polimorfizmu 2677G/A,T genu *ABCB1*, FA, FT, FG – startery przednie specyficzne względem allelu A, T, G; FK – starter przedni dla prążka kontrolnego; RR - starter tylny.

Reakcję prowadzono w termocyklerze w cyklicznie powtarzających się etapach:

- denaturacja wstępna – 5 min. 94°C
 - denaturacja – 30s, 95°C
 - przyłączanie starterów – 30s, 57°C
 - wydłużanie – 30s, 72°C
 - denaturacja – 30s, 95°C
 - przyłączanie starterów – 30s, 56°C
 - wydłużanie – 30s, 72°C
 - wydłużanie końcowe – 7 min, 72°C
 - denaturacja końcowa – 5 min. 94°C
- } Powtarzane cyklicznie 8 razy
- } Powtarzane cyklicznie 27 razy

Produkty reakcji PCR-ASA rozdzielano elektroforetycznie (1h, 80V) w 2% żelu agarozowym, wybarwionym bromkiem etydyny. Wynik elektroforezy obserwowano w świetle UV przy długości fali $\lambda=495\text{nm}$ (Rycina 12).



Rycina 12. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR-ASA.

Cyfry od 1-5 – numery prób; „w” próba kontrolna negatywna (woda); prążek o wielkości 353 pz – kontrola pozytywna; prążek o długości 222 pz – specyficzny względem allelu odpowiednio A – Adenina, T – Tymina, G – Guanina. pz – par zasad

Dla potwierdzenia specyficzności reakcji PCR-RFLP oraz PCR-ASA 10% prób DNA zsekwencjonowano metodą Sangera z wykorzystaniem zestawu BigDye v3.1 kit (Applied Biosystems) w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Wyniki sekwencjonowania potwierdziły obecność poszczególnych genotypów uzyskanych w reakcji PCR-RFLP oraz PCR-ASA.

3.2.6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu statystycznego Statistica v.8.0. Do oceny rozkładu genotypów w grupie badanej oraz kontrolnej wykorzystano test dokładnego prawdopodobieństwa Fishera. Analizę porównującą wskaźnik masy ciała w grupach badanej i kontrolnej a genotypem przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Natomiast zależność pomiędzy genotypem a parametrami kliniczno-hostologicznymi pacjentek oceniono za pomocą korelacji rang Spearmana a dla porównania rozkładów genotypów pomiędzy grupami zastosowano test χ^2 .

Za statystycznie znamiennej przyjęto wartość p poniżej 0,05 a jako miarę ryzyka związanego z badanym genotypem przyjęto iloraz szans (OR – *odds ratio*) z przedziałem ufności wynoszącym 95%.

3.2.7. Warunki hodowli *In vitro*

Hodowlę komórkową prowadzono na płytkach Petriego o średnicy 10 cm z zastosowaniem pożywki hodowlanej RPMI 1640 wzbogaconej 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS, ang. *fetal bovine serum*). Optymalne warunki hodowli (temperatura 37°C, 100% wilgotność i 5% CO₂) uzyskiwano stosując inkubator (Thermo Fisher Scientific). Po uzyskaniu 80% monowarstwy, w celu usunięcia inhibitorów trypsyny, komórki dwukrotnie przepłukiwano buforem PBS, dodano 0.25% roztwór trypsyny/EDTA i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37°C. Następnie zahamowano działanie trypsyny przez dodanie pożywki hodowlanej zawierającej 10% FBS. Zebrano komórki do jałowej 15 ml probówki wirówkowej i zliczano z użyciem komory Burkera oraz mikroskopu świetlnego. Zawiesinę komórek rozcieńczono do uzyskania odpowiedniego stężenia i naniesiono na jałowe płytki hodowlane. Pasaże komórek prowadzono w warunkach jałowych, w komorze z przepływem laminarnym (Heraeus).

3.2.8. Ocena przeżywalności komórek z wykorzystaniem testu MTT

Zasada metody oceny cytotoksyczności związku opiera się na określeniu żywotności komórek poprzez pomiar ich aktywności metabolicznej. Najczęściej stosowanym testem oceniającym przeżywalność komórek jest test MTT. W teście tym enzymy mikrosomalne oraz dehydrogenaza bursztynianowa przekształca żółty, rozpuszczony w wodzie barwnik bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy do nierozpuszczalnego, ciemnoniebieskiego formazanu. Związek ten ulega w dalszych etapach analizy rozpuszczeniu i jest mierzony spektrofotometrycznie w zakresie długości fal 492–570 nm. Intensywność barwy jest proporcjonalna do ilości aktywnych metabolicznie komórek.

W celu określenia, za pomocą testu MTT, cytotoksycznego działania doksorubicyny na komórki linii raka piersi (MCF7 i MDA-MB-231) naniesiono 5000 komórek/dołek na 96-dołkowe płytki titracyjne i inkubowano w obecności wzrastających stężeń doksorubicyny (10nM, 50nM, 100nM, 1µM, 10µM) przez 24, 48 lub 72 godziny. Równolegle prowadzono hodowlę komórek kontrolnych, nie traktowanych doksorubicyną. Po zakończeniu czasu inkubacji do każdego dołka dodano 10 µl MTT w stężeniu 5 mg/ml i kontynuowano inkubację przez kolejne 4 godziny. W kolejnym etapie, w celu lizy komórek, dodano 100 µl roztworu solubilizującego zawierającego 10% SDS w 0,01 N HCl. Po 24 godzinach od dodania roztworu solubilizującego mierzono absorbancję przy długości fali: 570 i 690 nm. Na podstawie uzyskanych wartości obliczano przeżywalność komórek i wyrażano ją w procentach względem kontroli. Podczas eksperymentu wykonano trzy powtórzenia badanego związku a każdy eksperyment powtórzono dwukrotnie i na podstawie uzyskanych wyników za pomocą oprogramowania CalcuSyn (ComboSyn) obliczono wartość stężenia doksorubicyny przy którym przeżywa 50% komórek (IC50).

3.2.9. Ocena proliferacji w czasie rzeczywistym - xCELLigence RTCA

System xCELLigence (Roche Diagnostics) pozwala na ocenę proliferacji komórek w czasie rzeczywistym bez konieczności ingerencji w prowadzoną hodowlę. Pomiar ilości komórek znajdujących się na dnie płytki opiera się na pomiarze oporności/przewodnictwa układu będącego miarą zlewności hodowli i jest wyrażany jako indeks komórkowy (CI, ang. *cell index*). W związku z czym urządzenie xCELLigence RTCA umożliwia ocenę nie tylko tempa proliferacji komórek adherentnych ale także cytotoksycznego działania związków oraz migracji i inwazji komórek w czasie rzeczywistym.

W celu określenia cytotoksycznego działania doksorubicyny na komórki linii MCF7 i MDA-MB-231, komórki hodowane na płytce Petriego poddano działaniu trypsyny, zebrano do 15 ml probówki i przeniesiono po 5000 komórek na dołek płytki dedykowanej do aparatu. Aby umożliwić adhezję komórek do dna podłoża inkubowano je przez 24h w optymalnych warunkach. Następnie do hodowli dodawano roztwór doksorubicyny w takiej ilości aby uzyskać stężenia dla komórek linii MCF7 równe: 0,18 μM , 0,9 μM , 1,8 μM , 2,7 μM , oraz dla linii MDA-MB-231: 0,001 μM , 0,01 μM , 0,5 μM , 1,8 μM . Eksperyment prowadzono w czasie 96 godzin, z pomiarem indeksu komórkowego co 5 minut.

3.2.10. Ocena proliferacji komórek w wybranych punktach czasowych

Ocena proliferacji komórek w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem xCELLigence RTCA opiera się na pomiarze wzrostu oporności wynikającej ze zwiększonej ilości komórek na powierzchni płytki. Metoda ta nie uwzględnia jednak zaburzeń odczytów wynikających ze zmian w morfologii komórek jak np. obkurczanie czy rozplaszczanie a mechanizmy te mają istotne znaczenie dla uzyskiwanych pomiarów. W związku z tym postanowiono ocenić liczbę komórek w wyznaczonych na podstawie wyników z xCELLigence RTCA punktach czasowych. W tym celu zawiesinę zawierającą 150 tys. komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 naniesiono na płytki Petriego o średnicy 6 cm i inkubowano przez 24 godziny w temp. 37°C, 5% zawartości CO₂ i 100% wilgotności powietrza. Następnie dodano 5 μl roztworu doksorubicyny w rozcieńczeniu umożliwiającym uzyskanie końcowego stężenia doksorubicyny - 0,5 μM lub 1,8 μM . Tak przygotowane komórki inkubowano w standardowych warunkach w aparacie xCELLigence RTCA przez ustalony czas tj. 12, 24, 36, 48, 60 lub 72 h. Po upływie założonego czasu inkubacji komórki odtrawiano za pomocą trypsyny zgodnie ze standardowymi procedurami (rozdział 3.2.7), zawieszono w pożywce hodowlanej i liczono w kamerze Fuchsa-Rosenthala z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego. Równoległe do komórek traktowanych doksorubicyną prowadzono hodowlę komórek kontrolnych, nie traktowanych związkiem.

3.2.11. Ocena morfologii komórek po ekspozycji na doksorubicynę

Ocenę morfologii komórek linii MCF7 oraz MDA-MB-231 wykonano po 24 godzinnej hodowli z doksorubicyną. W tym celu wykonano pasaż według standardowych procedur i następnie 150 tysięcy komórek naniesiono na 6 dołkową płytkę. Po 24 godzinach dodano doksorubicynę w stężeniu końcowym 1,8 μM i inkubowano kolejne 24 godziny.

Następnie usunięto pożywkę hodowlaną, komórki przepłukano ciepłym buforem PBS i osuszone komórki oglądano pod mikroskopem świetlnym przy powiększeniu 400x.

3.2.12. Ocena poziomu białka ABCB1 w komórkach linii MCF7 i MDA-MB-231

Zgodnie z danymi literaturowymi wystąpienie jednego ze wspomnianych polimorfizmów w genie *ABCB1* koreluje ze zmienioną ilością i aktywnością glikoproteiny P. Komórki linii MCF7 i MDA-MB-231 różnią się pod względem polimorfizmów genu *ABCB1* (rozdział 4.7). W związku z tym, aby ocenić wpływ wariantu allelu badanego genu na poziom białka ABCB1 wykonano następujące etapy testu:

- lizę komórek i izolację białek
- pomiar ilości białka metodą Bradford
- elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym
- analizę Western blot, immunoidentyfikację i wizualizację

Liza komórek

Aby otrzymać zawiesinę białek komórki linii MCF7 i MDA-MB-231 hodowano w standardowych warunkach do uzyskania 90% monowarstwy. Następnie komórki przepłukano buforem PBS i dodano bufor lizujący RIPA (+4C) zawierający inhibitory proteaz i fosfataz. Lizę komórek prowadzono w lodzie przez 45 min. co jakiś czas mieszając próby. Następnie próby wirowano 12000 g, 30 min., 4°C a nadsącz przeniesiono do nowych probówek i pobrano po 1 µl celem zmierzenia stężenia białka metodą Bradford. Pozostałą część lizatu komórkowego wymieszano z buforem obciążająco-redukującym i ogrzewano przez 6 minut w temperaturze 99 °C w celu denaturacji białka.

Pomiar stężenia białka

W celu standaryzacji ilości białka poddawanego rozdzielowi elektroforetycznemu zmierzono ilość białka metodą Bradford. Metoda ta polega na tworzeniu się barwnego kompleksu pomiędzy błękitem brylantowym G-250 a aromatycznymi resztami aminokwasowymi i spektrofotometrycznym pomiarze przy długości fali 595nm. Badane próby 500-krotnie rozcieńczono odczynnikiem Bradford zawierającym błękit brylantowy i inkubowano przez 15 min bez dostępu światła. Następnie za pomocą aparatu Eppendorf Biophotometr plus mierzono absorbcję prób i z krzywej wzorcowej odczytano stężenie białka w próbce.

Rozdział elektroforetyczny

Aby dokonać elektroforetycznego rozdzielania białka naniesiono 50 µg roztworu białka w 12% żel poliakryloamidowy. Ponadto, aby ułatwić identyfikację ocenianych białek w żel naniesiono wzorzec masy białek. Rozdział elektroforetyczny prowadzono dwuetapowo: elektroforezę zagęszczającą prowadzono przez 30 minut pod stałym napięciem prądu 50V; elektroforezę rozdzielającą przez 120 minut pod napięciem 100V.

Analiza Western blot, immunoidentyfikacja i wizualizacja

Fracje białek rozdzielonych w trakcie elektroforezy przeniesiono na błonę z polifluorku winylidenu (membrana PVDF) za pomocą techniki Western blot. Następnie, w celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał, błonę inkubowano na mieszadle horyzontalnym przy 50 rpm, w temperaturze pokojowej przez 1h w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w buforze TBST (ang. *Tris-buffered saline*, 0.1% Tween 20, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5). Na powierzchnię tak przygotowanej membrany dodano przeciwciało I-rzędowe (Cell Signaling Technology) i inkubowano na mieszadle hematologicznym przez 12h w temperaturze 4°C. Następnie, w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał błonę 5-krotnie płukano buforem TBST (5xTBST po 5 min). W kolejnym etapie błonę inkubowano 1h z przeciwciałem II-rzędowym wyznakowanym peroksydazą chrzanową (Cell Signaling Technology). Nadmiar przeciwciał usunięto płuczając membrany buforem TBST (5xTBST przez 5 min) a próby wizualizowano za pośrednictwem reakcji chemiluminescencji wywołanej przy użyciu zestawu Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific). Obserwowany sygnał powodował zaciemnienie na kliszy fotograficznej proporcjonalne do natężenia chemiluminescencji. Intensywność zaciemnienia prążków na kliszy fotograficznej, która jest proporcjonalna do stężenia białka w danej próbce. Kliszę fotograficzną wywołymano i przechowywano.

3.2.13. Ocena aktywności białka ABCB1

Polimorfizmy genu *ABCB1* mogą zmieniać strukturę białka ABCB1 a w konsekwencji jego aktywność. Postanowiono zatem ocenić aktywność białka ABCB1 w komórkach linii MCF7 oraz MDA-MB-231.

Rodamina 123 (Rh123) (Sigma-Aldrich) jest barwnikiem fluorescencyjnym, biernie wnika do komórki i lokowanym w mitochondriach. Jednocześnie barwnik ten jest substratem dla glikoproteiny P w związku z tym wykorzystano go do oceny różnic w aktywności glikoproteiny P w komórkach linii MCF7 i MDA-MB-231.

W tym celu wykonano pasaż komórek zgodnie ze standardowymi procedurami i naniesiono 12 tys. komórek na ciemnościenną 96-dokłkową płytkę. Po 24-godzinnej inkubacji dodano 100 µl pożywki hodowlanej zawierającej rodaminę 123 w stężeniu 5µg/ml. Komórki inkubowano 0,5, 1, 1,5 i 2,5h a następnie pożywkę hodowlaną zawierającą fluorochrom przeniesiono do nowej, ciemnościennnej płytki. Komórki przepłukano buforem PBS odczytywano poziom fluorescencji komórek za pomocą czytnika płytek EnSpire (PerkinElmer) przy długości fali 501nm (wzbudzenie) i 534nm (emisja) w obydwu płytkach. Długość fali ustalono eksperymentalnie wykonując widmo fluorescencji w zakresie długości fali: wzbudzenie 400-520nm, emisja 510-600nm.

3.3. Materiał badany

3.3.1. Grupa kontrolna i badana

Ocenę częstości występowania polimorfizmów genów *ABCBI*, *LEP* oraz *LEPR* wykonano w dwóch grupach: kobiet zdrowych oraz kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi. Do analizy obecności poszczególnych form badanych polimorfizmów wykorzystano DNA wyizolowane z leukocytów krwi obwodowej. Krew pobrano według standardowych procedur a jako antykoagulantu użyto wersenianu disodowego (EDTA). Pobrana krew do czasu analizy była przechowywana w temperaturze -20°C .

Wszystkie uczestniczki badania zostały poinformowane o tematyce badań i wyraziły zgodę na pobranie materiału oraz przeprowadzenie analiz DNA (załącznik - zgoda pacjenta). Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej działającej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu nr zgody: 309/10 i 568/18 (załącznik).

Grupa kontrolna

Grupę kontrolna stanowiły 202 zdrowe kobiety w wieku około menopauzalnym (wiek 57,8 +/- 8,2) będące dawczyniami krwi Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu, mieszkank województwa wielkopolskiego. Osoby te były diagnozowane jako wolne od choroby nowotworowej.

Stan zdrowia dawczyń krwi został oceniony przez lekarza za pomocą:

- wywiadu medycznego obejmującego m.in. wiek dawcy, przebyte choroby (choroby nowotworowe poza rakiem *in situ* trwale dyskwalifikują do bycia dawcą krwi), styl życia, przyjmowane leki, przebyte zabiegi i ingerencje chirurgiczne

- badania przedmiotowego uwzględniającego wzrost i masę ciała, pomiar temperatury ciała, ciśnienie krwi oraz tętno, ocenę węzłów chłonnych oraz zmian skórnych

- laboratoryjnych badań krwi obejmujących morfologię krwi, poziom białka całkowitego, obecność antygeny HBs, przeciwciał anti-HIV, przeciwciał anti-HCV, RNA HCV, DNA HBV oraz RNA HIV

Grupa badana

Grupę badaną stanowiło 209 kobiet w wieku 59,6 +/- 11 hospitalizowanych w Klinice Onkologii, Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, u których zdiagnozowano różne typy nowotworów piersi o różnym stopniu zaawansowania. U 180 pacjentek określono typ nowotworu i zaobserwowano, że najczęściej występującym (50,5%) był naciekający rak piersi (ang. *invasive ductal carcinoma IDC*). Ponadto zaobserwowano, że

w badanej grupie pacjentek u 34% kobiet występuje typ mieszany nowotworu, z pośród których najczęściej współwystępującymi nowotworami są naciekający rak piersi i rak przewodowy *in situ* - IDC DCIS 82% (ang. *invasive ductal carcinoma* IDC; *ductal carcinoma in situ* DCIS). Częstość poszczególnych typów nowotworów przedstawia tabela 8.

Tabela 8. Częstość występowania poszczególnych typów nowotworów piersi w grupie badanej.

Nazwa	Ilość n (%)
IDC	91 (50,5)
IDC DCIS	50 (28)
CT	5 (3)
DCIS	8 (4,4)
ILC	5 (3)
ILC DCIS	6 (3)
IDC CT	2 (1)
CM	5 (2,8)
CT	5 (2,8)
IDC DCIS CM	1 (0,5)
IDC DCIS CT	1 (0,5)
DCIS CT	1 (0,5)

IDC – ang. *invasive ductal carcinoma*, naciekający rak przewodowy; DCIS - *ductal carcinoma In situ*, rak przewodowy *in situ*; CT - *carcinoma tubulare*, rak cewkowy; ILC - *invasive lobular carcinoma*, naciekający rak zrazikowy; CM – *carcinoma mucinosum*, rak śluzowy. n – liczba prób

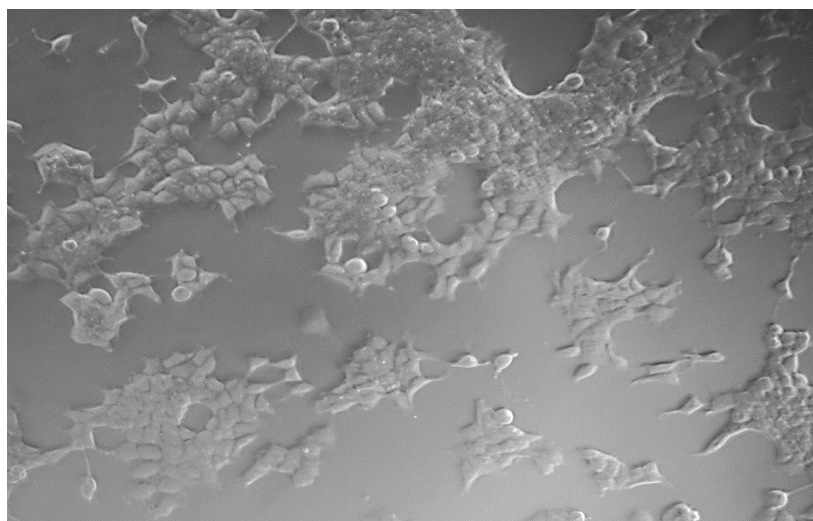
3.3.2. Linie komórkowe

W celu określenia zależności pomiędzy obecnością badanych polimorfizmów a odpowiedzią na leczenie chemioterapeutykami postanowiono określić profil molekularny dwóch linii komórkowych raka piersi: MCF7 i MDA-MB-231 i ocenić ich odpowiedź na działanie powszechnie stosowanego w leczeniu raka piersi chemioterapeutyku - doksorubicyny.

Linia komórkowa MCF7

MCF7 (ang. *Michigan Cancer Foundation 7*; ATCC HTB-22) to ustalona linia nabłonkowych komórek ludzkiego raka piersi pozyskana z zasobów ATCC (ang. *American Collection of Cell Cultures*). Komórki tej linii po raz pierwszy zostały wyizolowane w 1970 roku od 69-letniej kobiety rasy kaukaskiej chorującej na gruczolakoraka piersi. Komórki linii MCF7 mają kształt wielokątów, rosną w postaci skupisk i zostały scharakteryzowane jako komórki adherentne (Rycina 13). Komórki tej linii charakteryzują się wysoką ekspresją receptorów estrogenowych alfa (ERalfa), niskim poziomem receptorów estrogenowych beta (ERbeta) oraz receptorów dla naskórkowego czynnika wzrostu (HER2). Nie wykazują natomiast ekspresji receptora progesteronowego (PgR).

Hodowlę prowadzono w podłożu hodowlanym RPMI-1640 wzbogaconym 10% bydlęcą surowicą płodową FBS (ang. *fetal bovine serum*) w standardowych warunkach. Czas podwojenia komórek linii MCF7 wynosił około 29h.



Rycina 13 : Komórki nabłonkowe raka piersi linii MCF-7.

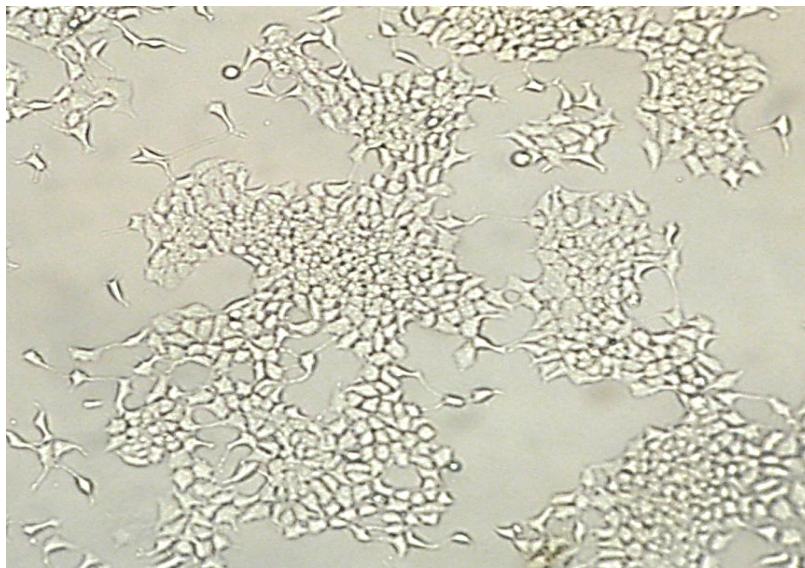
Komórki hodowano w monowarstwie. Powiększenie 100x, mikroskop Carl-Zeiss Axiovert 40.

Linia komórkowa MDA-MB-231

MDA-MB-231 (ang. Medical Doctor Anderson Metastatic Breast, ATCC HTB-26) to ustalona linia komórkowa ludzkiego raka piersi pozyskana z zasobów ATCC wyizolowana po raz pierwszy w 1973 roku od 51-letniej kobiety rasy kaukaskiej chorującej na raka piersi. MDA-MB-231 są komórkami nabłonkowymi adeherentnymi o wydłużonym, wrzecionowatym kształcie, równomiernie rosnącymi w monowarstwie (Rycina 14). Komórki te wykazują ekspresję transformującego czynnika wzrostu alfa (ang. *transforming growth factor Ralpha*, TGFalfa). Nie posiadają natomiast receptorów dla naskórkowego czynnika wzrostu HER2, receptorów estrogenowych ER i progesteronowych PgR.

Hodowlę prowadzono w podłożu RPMI-1640 wzbogaconym 10% FBS w standardowych warunkach.

Czas podwojenia komórek linii MDA-MB-231 wynosił około 24 h.



Rycina 14 : Komórki nabłonkowe raka piersi linii MDA-MB-231.

Komórki hodowano w monowarstwie. Powiększenie 100x, mikroskop Carl-Zeiss Axiovert 40.

4. Wyniki

4.1. Uzyskanie materiału do badań genetycznych i opracowanie bazy danych

Z krwi pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem piersi oraz kobiet stanowiących grupę kontrolną wyizolowano DNA, którego stężenie mieściło się w zakresie od 24ng/μl do 1400 ng/μl co stanowiło wystarczającą ilość do przeprowadzenia zaplanowanych badań molekularnych. Zależność absorbancji prób zmierzonych przy długości fali 260nm i 280nm, wykazało że 34 próbek nie mieści się w oczekiwanym zakresie 1,8-2,0. Świadczyło to o zanieczyszczeniu DNA i wymagało dalszych procedur oczyszczania.

4.2. Charakterystyka grupy kontrolnej i badanej

Grupę kontrolną stanowiły zdrowe kobiety w wieku około menopauzalnym (54.8 lat +/- 8.2). Natomiast do grupy badanej zakwalifikowano kobiety ze zdiagnozowanym rakiem piersi o różnym stopniu zaawansowania. Kobiety zakwalifikowane do obydwu grup były mieszkankami województwa wielkopolskiego.

U kobiet obydwu grup oceniono wzrost oraz wagę, na podstawie których obliczono wskaźnik masy ciała (BMI), który oblicza się poprzez podzielenie masy ciała podanej w kilogramach przez kwadrat wzrostu podanego w metrach. Na podstawie uzyskanych wyników, zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia, kobiety zakwalifikowano do trzech grup:

- z niedowagą BMI < 18,49
- z prawidłową masą ciała BMI 18,5 – 24,99
- z nadwagą BMI > 25

Tabela 9. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej

	Pacjentki (n=209)	Kontrola (n=202)	p
Wiek	59.6 +/- 11	57.8 +/- 8.2	
Waga (kg)	70.5 +/- 12.1	66.5 +/- 11.7	<0.001
Wzrost (cm)	162.6 +/- 6.1	136.3 +/- 5.4	0.201
BMI	26.6 +/- 4.29	24.94 +/- 4.18	<0.001
BMI <18,49	0	0	
BMI 18,5 – 24,99	39% (83)	55% (112)	
BMI > 25	61% (126)	45% (90)	<0.001

W badanych grupach nie było kobiet z BMI poniżej wartości prawidłowych. Natomiast częstość występowania nadwagi w grupie kobiet z rakiem piersi była istotnie większa niż wśród kobiet zdrowych (61% vs. 45%, $p < 0.001$).

U kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi za pomocą technik immunohistochemicznych oznaczano obecność receptorów: estrogenowego (ER), progesteronowego (PgR) oraz receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu HER2. Określono również stopień złośliwości nowotworu (G), rozmiar guza (T) oraz obecność przerzutów do węzłów chłonnych (N).

Tabela 10. Charakterystyka kliniczno-histologiczna guzów piersi

Oznaczany parametr	Symbol	% (n)
Receptor estrogenowy	ER +	81 (169)
	ER -	19 (40)
Receptor progesteronowy	PgR +	73 (153)
	PgR -	27 (56)
Receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu	HER +	18 (38)
	HER -	82 (171)
Stopień histologicznej złośliwości nowotworu	G1	35 (73)
	G2	40 (84)
	G3	20 (42)
	Gx	5 (10)
Wielkość guza pierwotnego	Tis	2 (3)
	T1	71 (148)
	T2	21 (43)
	T3	0 (0)
	T4	2 (4)
	Tx	5 (10)
Obecność przerzutów do węzłów chłonnych	N0	54 (113)
	N1	35 (74)
	N2	4 (8)
	N3	2 (4)
	Nx	5 (10)

ER – (ang. *Estrogen Receptor*) receptor estrogenowy, PgR – (ang. *Progesterone Receptor*) receptor progesteronowy, HER2 – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu, G – stopień histologicznego zróżnicowania, G – (ang. *Grade*) stopień histologicznego zróżnicowania nowotworu, T – (ang. *Tumor*) wielkość guza pierwotnego, N – (ang. *Nodules*) obecność komórek nowotworowych w węzłach chłonnych,

4.3. Analiza zależności pomiędzy częstością występowania polimorfizmów w grupie kobiet chorych na raka piersi oraz kobiet kontrolnych.

4.3.1. Polimorfizm genów *LEP* i *LEPR*

Produktem ekspresji genu *LEP* jest leptyna, cytokina która po połączeniu się z receptorem leptynowym (produkt ekspresji genu *LEPR*) reguluje ośrodek głodu w podwzgórz. Wydaje się jednak, że cytokina ta, ze względu na szereg innych funkcji pełnionych w organizmie m.in. stymulację wydzielania estrogenów, aktywację angiogenezy, zwiększanie migracji komórek, stymulację ekspresji receptora HER2 czy działanie prozapalne może także zwiększać ryzyko zachorowania na raka piersi. W związku z tym, postanowiono ocenić czy istnieje zależność pomiędzy obecnością polimorfizmów genów *LEP* i *LEPR* a zachorowaniem na raka piersi (Tabela 11). W tym celu oceniono obecność polimorfizmów genów *LEP* (2548 G/A) i *LEPR* (223Gln/Arg, 109Lys/Arg) u 209 kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi będących pacjentkami Szpitala Klinicznego im. Przemienienia Pańskiego w Poznaniu oraz u 202 kobiet będących dawczyniami krwi Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu, które stanowiły grupę kontrolną.

Tabela 11. Częstość występowania polimorfizmów genów *LEP* i *LEPR* w grupie kobiet z rakiem piersi oraz kobiet zdrowych

Gen SNP	Genotyp	Grupa Badana		Grupa kontrolna		WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V
		n=209	%	n=202	%			
<i>LEP</i> rs7799039 2548 G/A	GG	71	34	67	33	p=0,9153	p=0,2162	p=0,3909
	GA	98	47	88	43,5			
	AA	40	19	47	23,5			
<i>LEPR</i> rs1137101 223Gln/Arg	Gln/Gln	66	31,5	61	30	p=0,8280	p=0,0518	p=0,2233
	Gln/Arg	110	52,5	96	47,5			
	Arg/Arg	33	16	45	22,5			
<i>LEPR</i> rs1137100 109Lys/Arg	Lys/Lys	98	47	102	50,5	p=0,6168	p=0,0935	p=0,6997
	Lys/Arg	92	44	75	37			
	Arg/Arg	19	9	25	12,5			

WW – homozygota dzika; WV – heterozygota; VV – homozygota polimorficzna,

W przypadku analizy polimorfizmu 2548 G/A genu *LEP*, częstość występowania homozygot dzikich GG, heterozygot GA oraz homozygot polimorficznych AA w grupie kontrolnej wynosiła odpowiednio 33, 43,5 oraz 23,5% i była porównywalna do częstości tych genotypów w grupie badanej. W związku z czym analiza statystyczna nie wykazała istotnej zależności pomiędzy obecnością polimorfizmów genu *LEP* a zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi.

Podobne wnioski wysunięto analizując częstość występowania polimorfizmu 109Lys/Arg genu *LEPR* w ocenianych grupach (grupa kontrolna Lys/Lys - 50,5%, Lys/Arg - 37%, Arg/Arg - 12,5%; grupa badana odpowiednio 47, 44 i 9%). Analiza statystyczna także nie wykazała zależności pomiędzy występowaniem badanego polimorfizmu genu *LEPR*, a zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi.

Natomiast w przypadku analizy kolejnego polimorfizmu genu *LEPR*, zamiany glutaminy na argininę w pozycji 223 (223Gln/Arg) wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy częstością występowania formy polimorficznej Gln/Gln w grupie kontrolnej i badanej (16% vs 22,5%), a występowaniem pozostałych genotypów tj. heterozygot Gln/Arg i homozygot dzikich Arg/Arg.

4.3.2. Polimorfizmy genu *ABCB1*

Kolejnym czynnikiem zwiększającym ryzyko zachorowania na raka (także raka piersi) jest narażenie na ksenobiotyki tj. m.in. alkohol wysokoprocentowy, substancje zawarte w dymie tytoniowym, szereg leków (cytostatyki, sulfonamidy, izoniazyd, estrogeny), pestycydy. Aby uniknąć nadmiernej ekspozycji komórki na działanie ksenobiotyków związki te zostają usunięte z komórki za pomocą białka *ABCB1*, należącego do rodziny białek ABC a warunkującego m.in. oporność wielolekową. Białko to jest pompą przez błonową zależną od ATP i usuwa z komórki egzo- i endogenne substancje hydrofobowe. W wyniku tego działania zabezpiecza komórki przed toksycznym, prokancerogennym działaniem ksenobiotyków i zmniejsza prawdopodobieństwo inicjacji procesu nowotworowego. Z drugiej jednak strony glikoproteina P usuwa z komórki leki, tym samym zmniejsza ich efektywność działania. W związku z tym, że aktywność białka *ABCB1* może być zależna od polimorfizmów genu *ABCB1*, co w efekcie może zwiększać prawdopodobieństwo zachorowania na raka piersi, za pomocą technik PCR-RFLP oraz PCR-ASA wykonano analizę obecności polimorfizmów genu *ABCB1* 3435 C/T (PCR-RFLP) 2677 G/T, A (PCR-ASA) u kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi oraz u kobiet zdrowych (Tabela 12).

Uzyskane wyniki opisują częstość występowania poszczególnych alleli badanych polimorfizmów *ABCB1* w analizowanych grupach. Pozwoliło to na ocenę statystyczną i określenie zależności pomiędzy obecnością polimorfizmów a częstością/ryzykiem zachorowania na raka piersi.

Tabela 12. Częstość występowania polimorfizmów genu *ABCB1* w grupie kobiet z rakiem piersi oraz kobiet zdrowych.

Gen SNP	Genotyp	Grupa badana		Grupa kontrolna		WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V
		n=209	%	n=202	%			
<i>ABCB1</i> rs1045642 3435 C/T	CC	48	23	51	25	p=0,6461	p=0,1536	p=0,2106
	CT	96	46	102	50,5			
	TT	65	31	49	24,5			
<i>ABCB1</i> rs2032582 2677 G/T, A*	GG	90	43	68	33,5	p=0,0712	p=0,7573	p=0,1298
	G/T,A	92	44	101	50			
	T,A/T,A	27	13	33	16,5			

*ze względu na niską częstość występowania allelu A w tabeli przedstawiono łącznie allele polimorficzne T i A. WW – homozygota dzika; WV– heterozygota; VV – homozygota polimorficzna,

Porównując poszczególne genotypy polimorfizmu 3435C/T nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy częstością występowania homozygot dzikich CC w grupie kontrolnej i badanej (25 vs. 23%). Nie zaobserwowano także różnicy w częstości występowania homozygot polimorficznych TT w grupie kontrolnej jak i badanej (24,5 vs. 31%).

4.4. Analiza zależności pomiędzy obecnością polimorfizmów a obecnością nadwagi i otyłości (wartość BMI powyżej 24.9).

4.4.1. Polimorfizmy genów *LEP* i *LEPR*

Jednym z czynników zwiększających ryzyko zachorowania na raka piersi, zwłaszcza kobiet po menopauzie jest otyłość. Wynika to z faktu, że tkanka tłuszczowa uznawana jest jako jeden z narządów wydzielania wewnętrznego, produkuje szereg hormonów m.in. estrogeny, insulinę, insulinopodobny czynnik wzrostu a także leptynę przez co może pobudzać komórki gruczołu piersiowego do nadmiernej proliferacji i inicjacji procesu nowotworowego.

Leptyna produkowana jest przede wszystkim przez tkankę tłuszczową i na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego po połączeniu się z receptorem leptynowym znajdującym się w podwzgórzu reguluje ośrodek głodu. Jednakże poziom leptyny może być zależny także od polimorfizmów genów kodujących leptynę oraz receptor leptynowy. W związku z powyższym postanowiono ocenić częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 2548 G/A genu *LEP* oraz 223Gln/Arg i 109Lys/Arg genu *LEPR* u otyłych kobiet chorych na raka piersi oraz kobiet zdrowych (Tabela 13).

Mimo że grupa kobiet z rakiem piersi ma istotnie statystycznie większy, względem kobiet zdrowych, współczynnik BMI, nie wykazano zależności pomiędzy polimorfizmem 2548 G/A genu *LEP* i 223Gln/Arg genu *LEPR* a obecnością nadwagi zarówno u kobiet zdrowych jak i z rakiem piersi. Zauważono natomiast, że występowanie homozygot polimorficznych Arg/Arg (109Lys/Arg) genu *LEPR* koreluje z wystąpieniem nadwagi u kobiet z rakiem piersi.

Tabela 13. Częstość występowania polimorfizmów genów *LEP* i *LEPR* w grupie kobiet z rakiem piersi oraz kobiet zdrowych z prawidłową masą ciała oraz nadwagą

Gen SNP		Genotyp	Nadwaga (%)	Norma (%)	WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V
<i>LEP</i> rs7799039 2548 G/A	Grupa badana	GG	31	39	p=0,3722	p=0,6524	p=0,8068
		GA	53	41			
		AA	16	20			
	Grupa kontrolna	GG	32	34	p=0,8784	p=0,3956	p=0,4759
		GA	42	46			
		AA	26	27			
<i>LEPR</i> rs1137101 223Gln/Arg	Grupa badana	Gln/Gln	32,5	41	p=0,3741	p=0,8090	p=0,6241
		Gln/Arg	54	43			
		Arg/Arg	13,5	16			
	Grupa kontrolna	Gln/Gln	34	26	p=0,2711	p=0,3956	p=0,8389
		Gln/Arg	40	56			
		Arg/Arg	26	21			
<i>LEPR</i> rs1137100 109Lys/Arg	Grupa badana	Lys/Lys	48	41	p=0,4935	p=0,0599	p=0,1528
		Lys/Arg	47	45			
		Arg/Arg	5	14			
	Grupa kontrolna	Lys/Lys	49	55	p=0,5671	p=1,000	p=0,7401
		Lys/Arg	40	33			
		Arg/Arg	11	12			

WW – homozygota dzika; WV – heterozygota; VV – homozygota polimorficzna,

4.4.2. Polimorfizmy genu *ABCB1*

Białka z rodziny transporterów ABC, w tym także białko *ABCB1*, warunkują przede wszystkim usuwanie ksenobiotyków z wnętrza komórki chroniąc je tym samym przed ich toksycznym/kancerogennym działaniem. Jednakże białka te biorą także udział w transporcie substancji odżywczych takich jak węglowodany, aminokwasy, fosfolipidy, cholesterol czy związki steroidowe. Tym samym zaburzona funkcja tego przezłonowego systemu transportu może sprzyjać otyłości. Postanowiono zatem ocenić z jaką częstością występują poszczególne polimorfizmy genu *ABCB1* w grupie kobiet zdrowych oraz chorych o prawidłowej oraz nieprawidłowej masie ciała (Tabela 14).

Podobnie jak w przypadku polimorfizmów genów *LEP* i *LEPR* nie zaobserwowano istotnej statystycznie zależności pomiędzy obecnością polimorfizmów genu *ABCB1* a otyłością zarówno u kobiet zdrowych jak u kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi.

Tabela 14. Częstość występowania polimorfizmów genu *ABCB1* w grupie kobiet z rakiem piersi oraz kobiet zdrowych z prawidłową masą ciała oraz nadwagą.

Gen SNP		Genotyp	Nadwaga (%)	Norma (%)	WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V
<i>ABCB1</i> rs1045642 3435 C/T	Grupa badana	Lys/Arg	40	33	p=0,2396	p=0,8599	p=0,3489
		Arg/Arg	11	12			
		C/C	19,5	19,5			
	Grupa kontrolna	C/T	47	47	p=0,8717	p=0,6186	p=0,6161
		T/T	33,5	33,5			
		C/C	25	27			
<i>ABCB1</i> rs2032582 2677 G/T, A*	Grupa badana	C/T	49	51	p=1,000	p=0,2897	p=0,6128
		T/T	26	22			
		G/G	40	41			
	Grupa kontrolna	G/T,A	45,5	52	p=0,8739	p=0,3690	p=0,5089
		T,A/T,A	14,5	7			
		G/G	34	34			

*ze względu na niską częstość występowania allelu A w wynikach przedstawiono łącznie allele polimorficzne T i A. WW – homozygota dzika; WV – heterozygota; VV – homozygota polimorficzna,

4.5. Zależność pomiędzy występowaniem polimorfizmów a obecnością receptorów ER, PgR i HER2

Standardem w ocenie histologicznej raka piersi jest określenie obecności szeregu receptorów na powierzchni komórki m.in. receptorów estrogenowych (ER), progesteronowego (PgR) i receptora typu 2 dla naskórkowego czynnika wzrostu (HER2). Umożliwia to określenie stopnia zaawansowania choroby, a także wybór optymalnego schematu leczenia. Wykazano jednak, że na powierzchni komórek raka piersi występuje także receptor leptynowy, który po połączeniu z leptyną reguluje funkcjonowanie komórki stymulując ją m.in. do produkcji estrogenów i tym samym wzmożonej proliferacji. Zaobserwowano także obecność białka ABCB1 w błonie komórek nowotworowych. Możliwe zatem, że polimorfizmy genów *LEP*, *LEPR* (Tabela 15) oraz *ABCB1* (Tabela 16), które, jak się wydaje, mogą wpływać na zmianę aktywności kodowanych białek, mogą również korelować z ekspresją receptorów ER, PgR i HER2.

4.5.1. Polimorfizmy genów *LEP* i *LEPR*

W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano istotnie statystycznie częstsze występowanie alleli dzikich GG polimorfizmu 2458G/A u kobiet z ekspresją receptora progesteronowego. Wykazano także, że na powierzchni komórek raka piersi kobiet będących homozygotami dzikimi Gln/Gln pod względem polimorfizmu 223 Gln/Arg genu *LEPR* istotnie statystycznie rzadziej obserwuje się ekspresję receptora HER2.

Tabela 15. Zależność pomiędzy polimorfizmami genów *LEP* i *LEPR* a ekspresją receptorów: estrogenowych (ER), progesteronowych (PgR) i naskórkowego czynnika wzrostu (HER2)

Gen SNP	Genotyp	ER+ (%)	ER - (%)	WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V	PgR+ (%)	PgR- (%)	WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V	HER+ (%)	HER- (%)	WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V
<i>LEP</i> rs7799039 2548 G/A	GG	38	17	p=0,0591	p=1,000	p=0,2619	39,5	17,5	p=0,0227	p=0,6206	p=0,2601	26	30	p=0,8345	p=0,6330	p=0,5938
	GA	44	67				41	67,5				53	53			
	AA	18	17				19,5	15				21	17			
<i>LEPR</i> rs1137101 223Gln/Arg	Gln/Gln	35	42	p=0,6431	p=0,3511	p=1,000	35	41	p=0,5435	p=0,5846	p=0,8878	24,5	46,5	p=0,0324	p=0,1634	p=0,0199
	Gln/Arg	51	37,5				51	41				51	45			
	Arg/Arg	14	20,5				14	18				24,5	8,5			
<i>LEPR</i> rs1137100 109Lys/Arg	Lys/Lys	44,5	50	p=0,6584	p=0,6908	p=0,6090	42	56	p=0,1734	p=0,4597	p=0,1353	45	43	p=0,8517	p=1,000	p=1,000
	Lys/Arg	47	45				49	41				45	48			
	Arg/Arg	8,5	5				9	3				10	9			

WW – homozygota dzika; WV– heterozygota; VV – homozygota polimorficzna,

4.5.2. Polimorfizmy genu *ABCB1*

W badaniach na estrogenozależnych liniach raka piersi (MCF7 i T47D) wykazano, że estradiol zmniejsza ekspresję genu *ABCB1*. Nie zaobserwowano tej zależności w komórkach estrogenoniezależnych (MDA-MB-231). (146) W związku z czym wydaje się, że obecność hormonów płciowych może zwiększać efektywność leczenia przeciwnowotworowego. Z drugiej jednak strony może stymulować, poprzez połączenie się z receptorem estrogenowym, progresję nowotworu piersi.

Na poziom ekspresji oraz aktywność białka *ABCB1* mogą mieć także wpływ polimorfizmy genu *ABCB1*. (147) Postanowiono zatem ocenić czy obecność receptorów ER, PgR i HER2 koreluje z wystąpieniem polimorfizmu w grupie kobiet z rakiem piersi. Nie wykazano jednak zależności pomiędzy polimorfizmami genu *ABCB1* a obecnością bądź brakiem receptorów ER, PgR i HER2.

Tabela 16. Zależność pomiędzy polimorfizmami genu *ABCBI* a ekspresją receptorów: estrogenowych (ER), progesteronowych (PgR) i naskórkowego czynnika wzrostu (HER2)

Gen SNP	Genotyp	ER+ (%)	ER - (%)	WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V	PgR+ (%)	PgR- (%)	WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V	HER+ (%)	HER- (%)	WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V
<i>ABCBI</i> rs 1045642 3435 C/T	C/C	24	27	p=0,8112	p=0,4951	p=0,8842	24	27	p=0,8327	p=0,6871	p=1,000	29	52	p=0,6794	p=0,2924	p=0,3536
	C/T	49	38				49	41				49	42			
	T/T	27	35				27	32				22	32			
<i>ABCBI</i> rs2032582 2677 G/T, A*	G/G	45	37	p=0,5224	p=0,4841	p=0,4238	45	38	p=0,4490	p=0,2158	p=0,2542	42	40	p=1,000	p=0,5563	p=0,6726
	G/T,A	46	48				46	46				49	45			
	T,A/T,A	9	15				9	16				9	15			

*ze względu na niską częstość występowania allelu A w wynikach przedstawiono łącznie allele polimorficzne T i A.

WW – homozygota dzika; WV– heterozygota; VV – homozygota polimorficzna,

4.6. Ocena zależności pomiędzy obecnością polimorfizmów a wielkością guza pierwotnego (T), obecnością przerzutów do węzłów chłonnych (N) i histologicznym stopniem złośliwości (G) nowotworów

Zaawansowanie choroby nowotworowej piersi opiera się na ocenie histopatologicznej oraz klinicznej i uwzględnieniu wielkości guza pierwotnego, obecności przerzutów do węzłów chłonnych i narządów odległych a także histologiczny stopień zróżnicowania nowotworu.

Klasyfikacja pTNM określa kryteria oceniające wielkość guza pierwotnego, przerzuty do węzłów chłonnych oraz przerzuty odległe.

Wielkość guza pierwotnego T (ang. *Tumor*)

Tx – nie ma możliwości oceny guza pierwotnego

T0 – brak obecności guza pierwotnego

Tis – rak *In situ*

T1 – guz o średnicy do 20mm

T2 – guz o średnicy 20 – 50 mm

T3 – guz o średnicy >50mm

T4 – rak naciekający każdej wielkości z inwazją na ścianę klatki piersiowej i skórę

Przerzuty do węzłów chłonnych N (ang. *Nodules*)

Nx – brak możliwości oceny węzłów chłonnych

N0 – brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych lub molekularne cechy przerzutów przy negatywnej ocenie histopatologicznej

N1 – obecność komórek nowotworowych w 1-3 regionalnych węzłach chłonnych

N2 – obecność komórek nowotworowych w 4-9 regionalnych węzłach chłonnych lub węzłach chłonnych piersiowych przy braku komórek nowotworowych w pachowych węzłach chłonnych

N3 - obecność komórek nowotworowych w >10 regionalnych węzłach chłonnych lub w węzle nadobojczykowym lub >3 pachowych i piersiowych wewnętrznych węzłach chłonnych

Stopień zróżnicowania histologicznego nowotworu G (ang. *Grade*) dzieli się na 3 stopnie na podstawie mikroskopowej oceny zdolności do tworzenia cewek, wielkości jąder komórkowych oraz wskaźnika mitotycznego. (148)

Ze względu na brak danych dotyczących stopnia przerzutów do narządów odległych nie uwzględniono ich w niniejszej pracy.

Rutynowo oceniane parametry stopnia zaawansowania nowotworu skorelowano z badanymi polimorfizmami celem określenia zależności pomiędzy obecnością polimorfizmu a stopniem zaawansowania choroby.

4.6.1. Polimorfizmy genów *LEP* i *LEPR*

W badaniach na liniach komórkowych raka piersi wykazano zależność pomiędzy wzrostem stężenia leptyny a zwiększoną proliferacją komórek i stopniem przerzutowania. Możliwe jest zatem, że obecność polimorfizmów w genach *LEP* i *LEPR* może korelować ze stopniem zaawansowania raka piersi wyrażonym wielkością guza pierwotnego, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych oraz stopniem histologicznego zróżnicowania nowotworu (Tabela 17-19).

Jednakże, w przeprowadzonych badaniach nie wykazano istotnej statystycznie zależności pomiędzy obecnością polimorfizmów genów *LEP* i *LEPR* a ocenianymi parametrami.

Tabela 17. Zależność pomiędzy obecnością poszczególnych alleli polimorfizmów genów *LEP* i *LEPR* a wielkością guza pierwotnego

Gen SNP	genotyp	Wielkość guza					WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V
		0	1	2	3	4			
<i>LEP</i> rs7799039 2548 G/A	GG	50	32	40	0	100	p=0,521	p=0,128	p=0,229
	GA	25	46	53	0	0			
	AA	25	22	7	100	0			
<i>LEPR</i> rs1137101 223Gln/Arg	Gln/Gln	25	34	40	0	0	p=0,680	p=0,518	p=0,963
	Gln/Arg	75	52	47	100	0			
	Arg/Arg	0	14	13	0	100			
<i>LEPR</i> rs1137100 109Lys/Arg	Lys/Lys	75	44	50	0	100	p=0,933	p=0,385	p=0,753
	Lys/Arg	25	46	47	100	0			
	Arg/Arg	0	10	3	0	0			

WW – homozygota dzika; WV– heterozygota; VV – homozygota polimorficzna,

Tabela 18. Zależność pomiędzy obecnością poszczególnych alleli polimorfizmów genów *LEP* i *LEPR* a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych

Gen SNP	Genotyp	Ilość zajętych węzłów chłonnych				WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V
		0	1	2	3			
<i>LEP</i> rs7799039 2548 G/A	GG	35	35	16	0	p=0,412	p=0,340	p=0,290
	GA	50	47	67	75			
	AA	15	18	17	25			
<i>LEPR</i> rs1137101 223Gln/Arg	Gln/Gln	36	28	17	75	p=0,613	p=0,480	p=0,482
	Gln/Arg	52	53	67	25			
	Arg/Arg	12	19	16	0			
<i>LEPR</i> rs1137100 109Lys/Arg	Lys/Lys	47	43	50	0	p=0,379	p=0,752	p=0,495
	Lys/Arg	44	51	50	75			
	Arg/Arg	9	6	0	25			

WW – homozygota dzika; WV – heterozygota; VV – homozygota polimorficzna,

Tabela 19. Zależność pomiędzy obecnością poszczególnych alleli polimorfizmów genów *LEP* i *LEPR* a histopatologicznym stopniem złośliwości guza pierwotnego

Gen SNP	Genotyp	Stopień złośliwości histopatologicznej			WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V
		1	2	3			
<i>LEP</i> rs7799039 -2548 G/A	GG	41	31	24	p=0,092	p=0,996	p=0,228
	GA	45	41	67			
	AA	4	18	9			
<i>LEPR</i> rs1137101 223Gln/Arg	Gln/Gln	34	33	39	p=0,681	p=0,438	p=0,510
	Gln/Arg	43	53	48			
	Arg/Arg	23	14	12			
<i>LEPR</i> rs1137100 109Lys/Arg	Lys/Lys	52	41	42	p=0,292	p=0,636	p=0,427
	Lys/Arg	39	52	51			
	Arg/Arg	9	7	7			

WW – homozygota dzika; WV – heterozygota; VV – homozygota polimorficzna,

4.6.2. Polimorfizmy genu *ABCB1*

Szereg badań wskazuje na zależność pomiędzy wzrostem ilości lub aktywności białka *ABCB1* a szybszym rozwojem choroby, zwiększonym odsetkiem przerzutów do węzłów chłonnych czy wyższym stopniem histologicznego zróżnicowania. W związku z tym, że na ilość oraz aktywność białka *ABCB1* mogą mieć wpływ polimorfizmy genu *ABCB1* postanowiono ocenić zależność pomiędzy polimorfizmem 3435 C/T oraz 2677 G/T, A* a wielkością guza pierwotnego (Tabela 20), ilością zajętych węzłów chłonnych (Tabela 21) oraz histologicznym stopniem złośliwości histopatologicznej (Tabela 22).

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych parametrów opisujących stopień klinicznego zaawansowania raka piersi w grupach pacjentek o różnym genotypie.

Tabela 20. Zależność pomiędzy obecnością poszczególnych alleli polimorfizmów genu *ABCB1* a wielkością guza pierwotnego

Gen SNP	Genotyp	Wielkość guza					WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V
		0	1	2	3	4			
<i>ABCB1</i> rs1045642 3435 C/T	CC	33	25	18	0	0	p=0,173	p=0,516	p=0,245
	CT	33	45	49	0	50			
	TT	34	30	33	0	50			
<i>ABCB1</i> r2032582 2677 G/T, A*	GG	63	44	38	0	0	p=0,359	p=0,129	p=0,782
	G/T,A	53	43	59	0	0			
	T,A/T,A	0	13	3	0	0			

*ze względu na rzadkie występowanie allelu A w wynikach przedstawiono łącznie allele polimorficzne T i A. WW – homozygota dzika; WV– heterozygota; VV – homozygota polimorficzna,

Tabela 21. Zależność pomiędzy obecnością poszczególnych alleli polimorfizmów genu *ABCB1* a ilością zajętych węzłów chłonnych

Gen SNP	genotyp	Ilość zajętych węzłów chłonnych				WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V
		0	1	2	3			
<i>ABCB1</i> rs1045642 3435 C/T	CC	22	26	33,5	25	p=0,563	p=0,851	p=0,654
	CT	48	46	33,5	50			
	TT	29	28	33	25			
<i>ABCB1</i> rs2032582 2677 G/T, A*	GG	46	41	14	0	p=0,430	p=0,281	p=0,742
	G/T,A	41	45	57	100			
	T,A/T,A	13	14	29	0			

*ze względu na rzadkie występowanie allelu A w wynikach przedstawiono łącznie allele polimorficzne T i A. WW – homozygota dzika; WV– heterozygota; VV – homozygota polimorficzna,

Tabela 22. Zależność pomiędzy obecnością poszczególnych alleli polimorfizmów genu *ABCB1* a stopniem złośliwości histopatologicznej

Gen SNP	Genotyp	Stopień złośliwości histopatologicznej			WW vs. WV, VV	WW, WV vs. VV	W vs. V
		1	2	3			
<i>ABCB1</i> rs1045642 3435 C/T	CC	21	25	22	p=0,798	p=0,634	p=0,862
	CT	53	33	50			
	TT	26	42	28			
<i>ABCB1</i> rs2032582 2677 G/T, A*	GG	46	38	47	p=0,817	p=0,426	p=0,945
	G/T,A	43	48	50			
	T,A/T,A	11	14	3			

*ze względu na niską częstość występowania allelu A w wynikach przedstawiono łącznie allele polimorficzne T i A. WW – homozygota dzika; WV– heterozygota; VV – homozygota polimorficzna,

4.7. Analiza polimorfizmów genów *LEP*, *LEPR* i *ABCB1* w modelu komórkowym.

W związku ze złożonością funkcjonowania ludzkiego organizmu i dużą heterogennością grupy badanej oraz kontrolnej bardzo trudno było dokonać analizy wieloczynnikowej, która mogłaby określić udział jednego czynnika (polimorfizm) w metabolizmie całego organizmu. Dlatego też, podjęto próbę oceny wpływu polimorfizmów genów *LEP*, *LEPR* oraz *ABCB1* na komórkę z wykorzystaniem dwóch ustalonych linii komórkowych raka piersi. W tym celu oceniono genotyp komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 (Tabela 23)

Tabela 23. Rozkład alleli polimorfizmów genów *LEP*, *LEPR* i *ABCB1* w komórkach raka piersi

Gen SNP	Linie komórkowe	
	MCF7	MDA-MB-231
<i>LEP</i> rs7799039 2548 G/A	G/G	G/A
<i>LEPR</i> rs1137101 223Gln/Arg	Gln/Gln	Gln/Gln
<i>LEPR</i> rs1137100 109Lys/Arg	Lys/Lys	Lys/Lys
<i>ABCB1</i> rs1045642 3435 C/T	C/C	T/T
<i>ABCB1</i> rs2032582 2677 G/T, A*	G/G	G/T

*ze względu na niską częstość występowania allelu A w wynikach przedstawiono łącznie allele polimorficzne T i A.

Estrogenozależne komórki linii MCF7 charakteryzują się obecnością alleli dzikich zarówno pod względem polimorfizmu 3435 C/T jak i 2677 G/T, A. Z kolei estrogeniezależne komórki linii MDA-MB-231 pod względem polimorfizmu 3435 C/T charakteryzują się obecnością dwóch alleli polimorficznych. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy omawianymi liniami pod względem polimorfizmów genów *LEP* i *LEPR*. W związku z tym kolejne badania skupiły się na wyjaśnieniu wpływu polimorfizmów genu *ABCB1* na poziom i aktywność białka ABCB1.

4.8. Odpowiedź komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 na działanie doksorubicyny

Komórki linii MCF7 będące homozygotą dziką pod względem badanych polimorfizmów (3435CC, 2677TT) oraz komórki MDA-MB-231, które scharakteryzowano jako homozygoty polimorficzne 3435CC oraz heterozygotę 2677GT poddano działaniu doksorubicyny. Doksorubicyna jest lekiem należącym do grupy antracyklin i jest stosowana w leczeniu wielu rodzajów nowotworów w tym raka piersi. Jednakże efektywność leczenia doksorubicyną nie zawsze jest zadowalająca. Może to wynikać z obecności białka ABCB1 aktywnie transportującego ksenobiotyki, w tym doksorubicynę, z wnętrza komórki i tym samym zmniejszającego oczekiwany efekt terapeutyczny. W związku z tym, za pomocą testu MTT oraz urządzenia xCELLigence RTCA oceniono wpływ doksorubicyny na przeżywalność komórek raka piersi, który w dalszym etapie został zweryfikowany za pomocą oceny mikroskopowej oraz techniki liczenia komórek w poszczególnych punktach czasowych.

4.8.1. Ocena przeżywalności komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 za pomocą testu MTT

Ocenę wpływu doksorubicyny na przeżywalność komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 wykonano za pomocą testu MTT. Analizę przeprowadzono w trzech punktach czasowych 24, 48 i 72 godzin inkubacji z doksorubicyną w zakresie stężeń 0,1 – 1 μM . Na podstawie uzyskanych wartości absorbancji obliczono wskaźnik IC50 umożliwiający określenie stężenia doksorubicyny przy którym przeżywa 50% komórek.

Tabela 24. Wartości wskaźnika IC50 komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 poddanych działaniu doksorubicyny

	24h	48h	72h
MCF7	3,8 μM +/- 0,60	2,56 μM +/- 0,43	0,12 μM +/- 0,04
MDA-MB-231	2,75 μM +/- 0,65	1,47 μM +/- 0,35	0,10 μM +/- 0,08

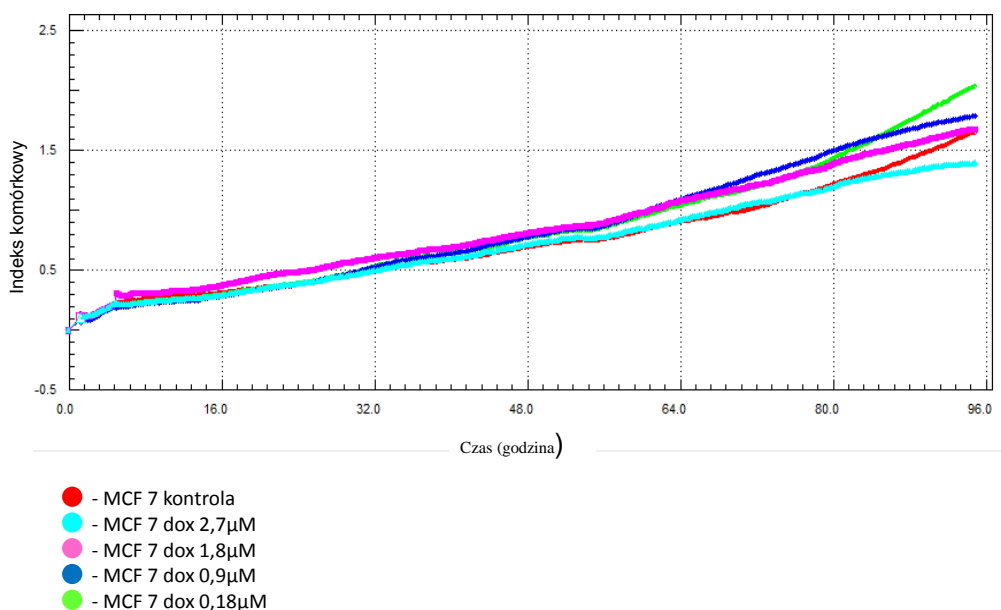
Wyniki przedstawiają średnią wartość IC50 obliczoną na podstawie 3 niezależnych eksperymentów.

Wykazano, że komórki linii MDA-MB-231 po 24h inkubacji już przy stężeniu doksorubicyny 2,75 μM wykazują 50% przeżywalność, natomiast komórki linii MCF7 wartość IC50 mają wyższą i wynosi ona 3,8 μM , co sugeruje większą ich oporność na stosowany lek. Podobną zależność obserwuje się po 48 godzinach inkubacji z doksorubicyną. (Tabela 24)

4.8.2. Ocena przeżywalności komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 za pomocą RTCA xCELLigence

Test MTT umożliwia ocenę żywotności komórek w konkretnych punktach czasowych, nie dając informacji w jaki sposób komórki reagują w pozostałych interwałach czasowych. Postanowiono zatem, za pomocą zestawu xCELLigence RTCA, ocenić w czasie rzeczywistym wpływ dokсорubicyny na komórki MCF7 i MDA-MB-231. Test MTT wykazał większą wrażliwość komórek linii MDA-MB-231 na działanie dokсорubicyny zatem komórki tej linii traktowano niższymi stężeniami związku (0,001 μM , 0,01 μM , 0,5 μM i 1,8 μM) a komórki linii MCF7 wyższymi stężeniami dokсорubicyny (0,18 μM , 0,9 μM , 1,8 μM i 2,7 μM). Eksperyment prowadzono przez 96 godzin a pomiar indeksu komórkowego wykonywano co 5 minut.

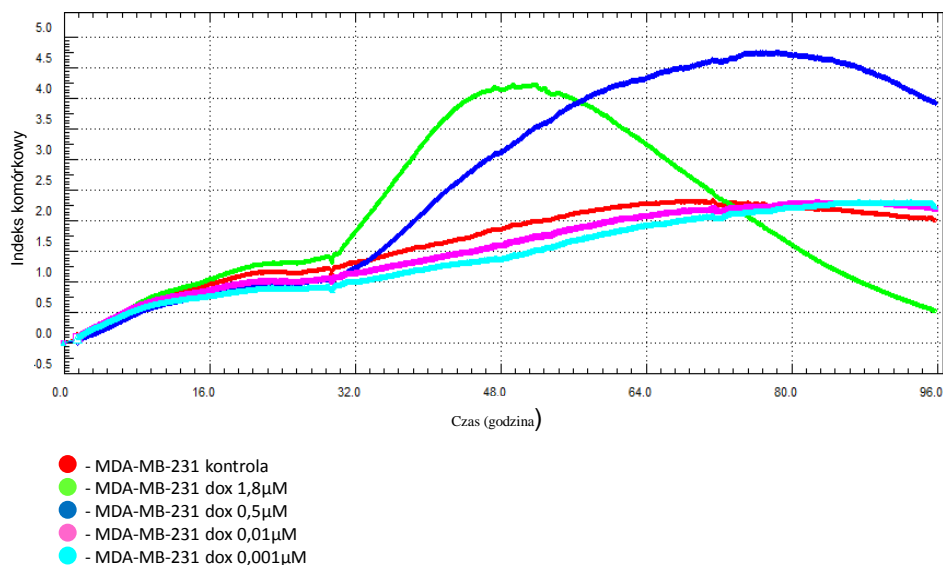
MCF 7



Wykres 2. Wpływ dokсорubicyny na indeks komórkowy komórek linii MCF7 traktowanych dokсорubicyną w różnych stężeniach.

Linia koloru czerwonego oznacza komórki kontrolne, nie traktowane dokсорubicyną. Pozostałe kolory linii odpowiadają różnym stężeniom dokсорubicyny. Komórki poddano traktowaniu związkiem po 24 godzinach od pasażu.

MDA-MB-231



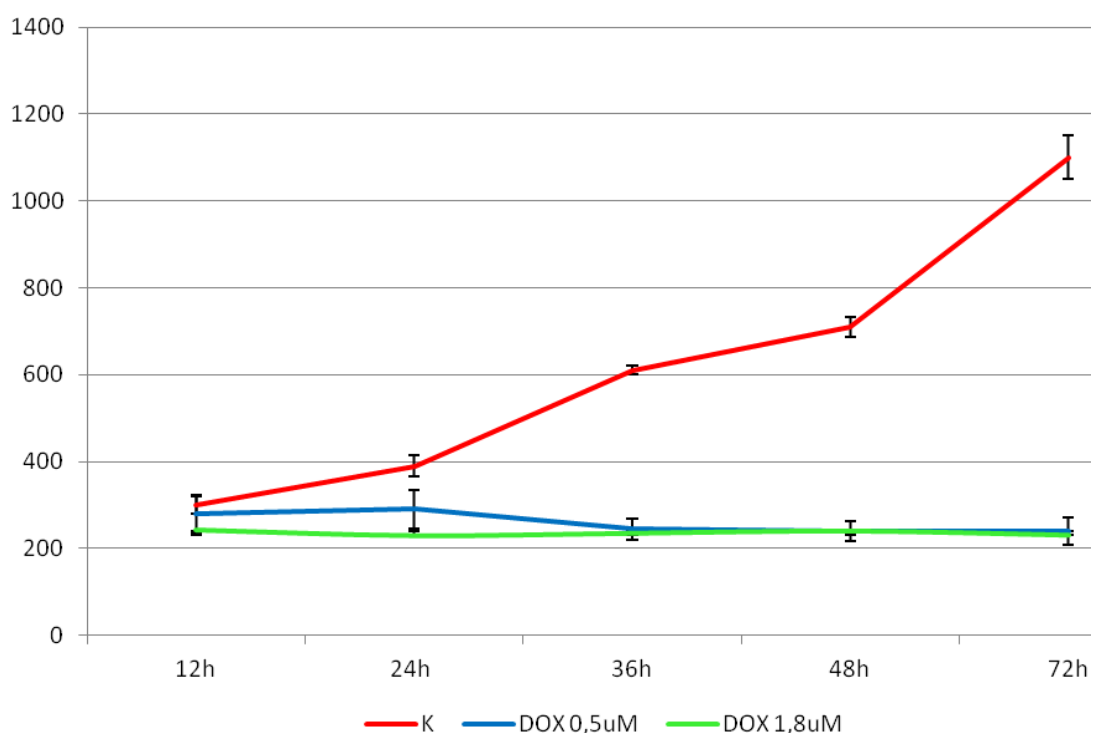
Wykres 3. Wpływ doksorubicyny na indeks komórkowy komórek linii MDA-MB-231 traktowanych doksorubicyną w różnych stężeniach.

Linia koloru czerwonego oznacza komórki kontrolne, nie traktowane doksorubicyną. Pozostałe kolory odpowiadają różnym stężeniom doksorubicyny. Komórki poddano traktowaniu związkiem po 24 godzinach od pasażu.

W przypadku komórek linii MCF7 nie zaobserwowano istotnych różnic w przeżywalności komórek kontrolnych oraz komórek poddanych traktowaniu doksorubicyną. Zauważono niewielki spadek indeksu komórkowego po 96 godzinach inkubacji komórek poddanych traktowaniu doksorubicyną w najwyższym stężeniu (2,7μM), a także wzrost indeksu komórkowego w przypadku zastosowania doksorubicyny w stężeniu 0,18μM (Wykres 2). Natomiast komórki linii MDA-MB-231 przy stężeniu doksorubicyny 1,8μM i 48 godzinach inkubacji oraz 0,5μM i 70 godzinach inkubacji wykazują znaczny wzrost indeksu komórkowego (Wykres 3). Jest to zaskakująca obserwacja, zwłaszcza że jak wcześniej wykazano w teście MTT, komórki tej linii są bardziej wrażliwe na cytotoksyczne działanie doksorubicyny. Taki efekt działania doksorubicyny może wynikać ze zwiększonej proliferacji komórek lub ze zwiększonej powierzchni styku z płytką wynikającej ze zmiany morfologii komórki. Postanowiono zatem ocenić zmiany w morfologii komórek linii MCF7 oraz MDA-MB-231 a także zmiany w ilości komórek w poszczególnych punktach czasowych.

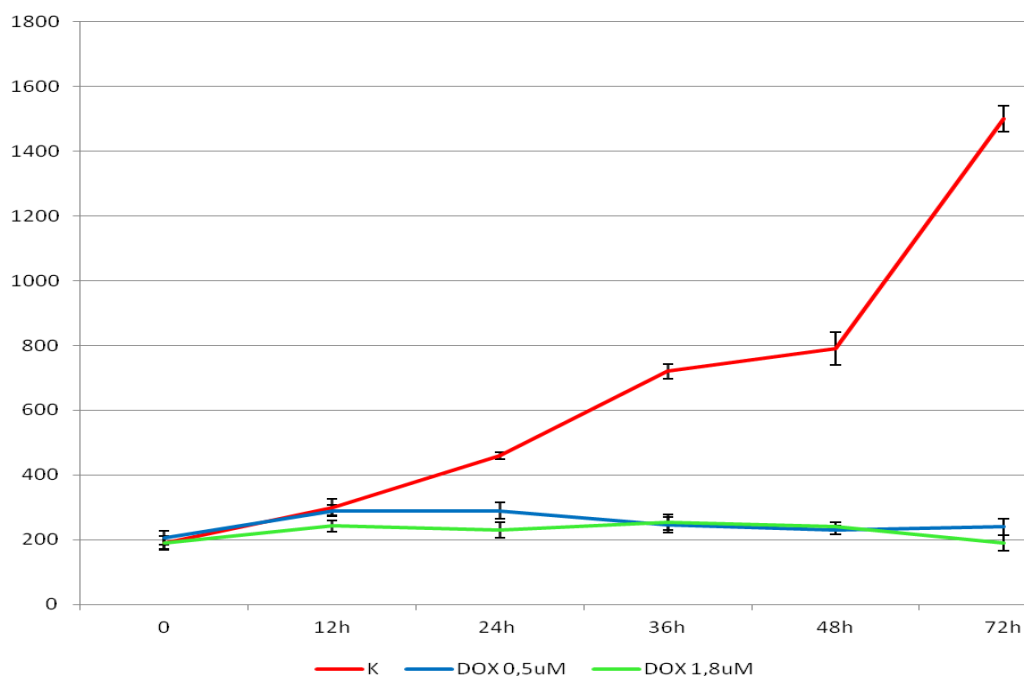
4.8.3. Ocena ilości oraz morfologii komórek linii MCF7 i MDA-MB-231

Analiza wyników uzyskanych w teście RTCA xCELLigence wskazała na wzrost indeksu komórkowego komórek linii MDA-MB-231. Jest to sprzeczne z wynikami uzyskanymi w teście MTT, które wskazywały na większą wrażliwość komórek tej linii na działanie doksorubicyny względem komórek linii MCF7. Postanowiono zatem za pomocą mikroskopu świetlnego ocenić morfologię badanych komórek poddanych działaniu doksorubicyny i sprawdzić zmianę w ilości komórek po 12, 24, 36, 48 i 72 godzin od dodania 0,5 oraz 1,8 μM doksorubicyny.



Wykres 4. Wpływ doksorubicyny na liczebność komórek linii MCF7.

Komórki poddano 24 godzinnej preinkubacji po której dodano związek i liczone komórki po 12, 24, 36, 48 i 72 godzinach inkubacji z doksorubicyną. Wykres przedstawia uśrednione wyniki z dwóch niezależnych eksperymentów. Czas 0 określa moment dodania doksorubicyny.

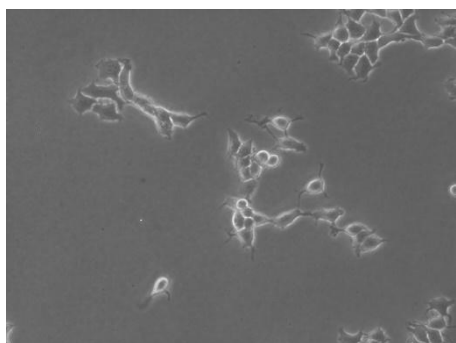


Wykres 5. Wpływ doksorubicyny na liczebność komórek linii MDA-MB-231.

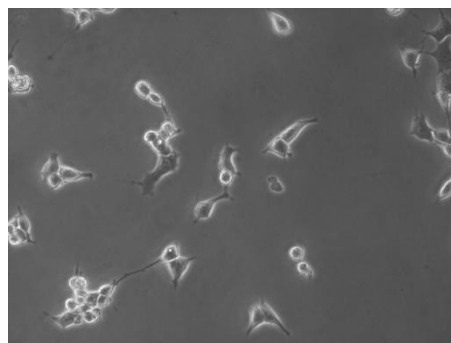
Komórki poddano 24 godzinnej preinkubacji po której dodano związek i liczone komórki po 12, 24, 36, 48 i 72 godzinach inkubacji z doksorubicyną. Wykres przedstawia uśrednione wyniki z dwóch niezależnych eksperymentów. Czas 0 określa moment dodania doksorubicyny.

Wykazano spadek liczby komórek zarówno linii MCF7 jak i MDA-MB-231 pod wpływem zastosowanych stężeń doksorubicyny. W związku z tym oceniono morfologię komórek linii MCF7 oraz MDA-MB-231 poddanych 24 godzinnej inkubacji z doksorubicyną w stężeniu 1,8µM (Rycina 15).

A



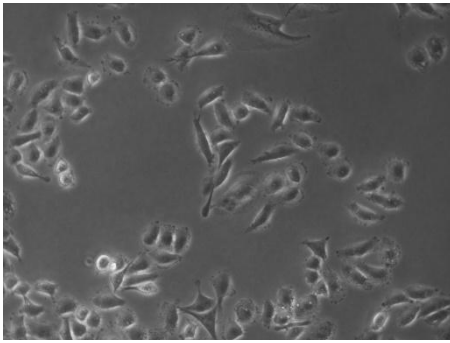
B



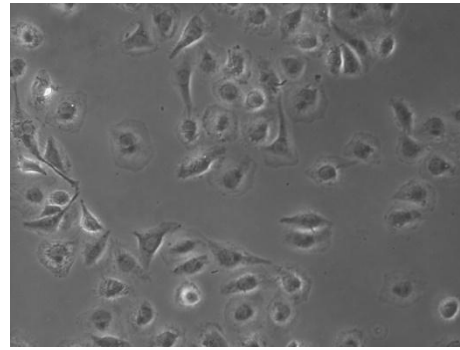
Rycina 15. Morfologia komórek linii MCF7 poddanych działaniu doksorubicyny

A – komórki kontrolne, B – komórki poddane 24 godzinnej inkubacji z 1,8µM doksorubicyną. Powiększenie 100x. Mikroskop Carl Zeiss Axiostar.

A



B



Rycina 16. Morfologia komórek linii MDA-MB-231 poddanych działaniu doksorubicyny
 A – komórki kontrolne, B – komórki poddane 24 godzinnej inkubacji z 1,8μM doksorubicyną. Powiększenie 100x

Zaobserwowano zmianę kształtu, wielkości oraz objętości cytoplazmy w komórkach linii MDA-MB-231 oraz wzrost ich powierzchni pod wpływem działania doksorubicyny. Zmian tych nie zaobserwowano w komórkach linii MCF7 traktowanych doksorubicyną.

4.9. Analiza zależności pomiędzy obecnością polimorfizmów genu *ABCB1* a aktywnością białka *ABCB1* w komórkach raka piersi *in vitro*.

Komórki linii MDA-MB-231 wykazują większą, względem komórek linii MCF7, wrażliwość na działanie doksorubicyny. Może to wynikać z obniżonej ilości bądź aktywności glikoproteiny P i w efekcie kumulacji leku w komórce. Postanowiono zatem ocenić różnice w aktywności glikoproteiny P w badanych liniach komórkowych. W tym celu komórki linii MCF7 (scharakteryzowane jako homozygoty dzikie 3435 CC i 2677 GG) oraz komórki linii MDA-MB-231 (scharakteryzowane jako homozygoty polimorficzne 3435 TT oraz heterozygoty 2677 GT) inkubowano z substratem dla glikoproteiny P – rodaminą 123 w stężeniu 5 μg/ml a następnie oceniono poziom fluorescencji komórek w czasie 0, 30 min, 1h, 1,5h, oraz 2,5h inkubacji.

Tabela 25. Poziom fluorescencji komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 będącej wynikiem kumulacji w komórce rodaminę 123.

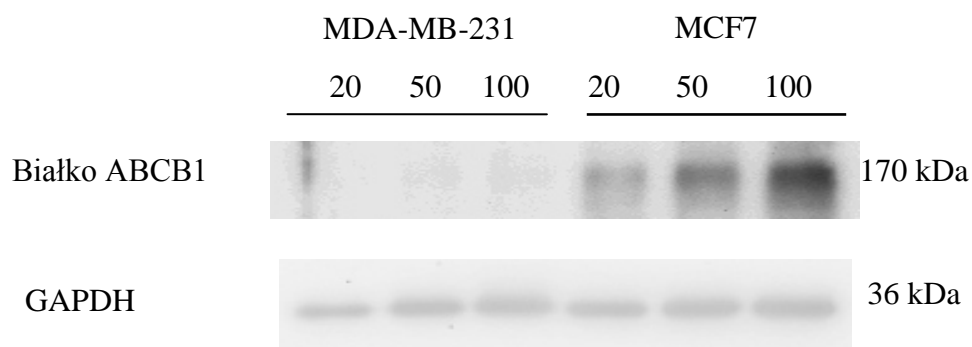
Linia komórkowa	Genotyp	Interwały czasowe (h)				
		0	0,5	1	1,5	2,5
		Względny poziom fluorescencji				
MCF7	3435 CC 2677GG	7,5 +/-1	22,5 +/-2	31,5 +/-1	24 +/-0,5*	23,5 +/-1
MDA-MB-231	3435 TT 2677GT	8,5 +/- 1	26,5 +/- 1	40,5 +/- 1	46,5 +/-1*	6 +/-1

Analizie poddano komórki z 21 pasażu. Komórki inkubowano z fluorochromem-rodaminą 123 przez 0,5, 1, 1,5 i 2,5 godziny, następnie odpłukano nadmiar fluorochromu i mierzono fluorescencję. Tabela przedstawia uśrednione wyniki z 2 niezależnych eksperymentów. Analiza statystyczna wykonana testem Spermmana * $p=0,04$;

Wykazano, że w komórkach linii MCF7 maksimum fluorescencji obserwuje się po 1-godzinnej inkubacji rodaminą 123 a następnie fluorescencja spada. Natomiast komórki linii MDA-MB-231 wykazują wyższą fluorescencję a maksimum osiągają po 1,5 godzinie. Może to wynikać z mniejszej ilości białka ABCB1 w komórkach linii MDA-MB-231 lub jego niższej aktywności, która koreluje z polimorfizmem 3435 TT (Tabela 25).

4.10. Analiza poziomu białka ABCB1 w komórkach linii MCF7 i MDA-MB-231

W związku z tym, że, jak wykazano, komórki linii MCF7 i MDA-MB-231 różnią się aktywnością glikoproteiny P postanowiono sprawdzić czy efekt ten wynika z różnic w ilości białka w błonie komórkowej. Za pomocą techniki Western Blot określono różnice w ilości białka pomiędzy badanymi liniami komórkowymi .



Rycina 17. Analiza poziomu białka ABCB1 w komórkach linii MDA-MB-231 i MCF7

Analizę ilości białka ABCB1 w komórkach linii MDA-MB-231 i MCF7 przeprowadzono z wykorzystaniem techniki Western blot. Na 12% żel poliakrylamidowy naniesiono 20, 50 i 100µg białka uzyskanego podczas lizy komórek po 24 godzinach od naniesienia na płytkę. Eksperyment wykonano na komórkach po 15 pasażach. Zdjęcia przedstawiają reprezentatywne wyniki uzyskane z 3 niezależnych eksperymentów.

Wykazano, że poziom glikoproteiny P w komórkach linii MDA-MB-231 jest znacznie niższy niż w komórkach linii MCF7. Dopiero przy 100µg nałożonego białka wyizolowanego z komórek linii MDA-MB-231 uzyskuje się słabo widoczny sygnał. W komórkach linii MCF7 uzyskano znaczny sygnał już przy 20 µg nałożonego białka. (Rycina 17)

5. Dyskusja

Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem wśród kobiet i stanowi drugą, pod względem liczebności, przyczynę śmierci kobiet. Ze względu na wiele czynników biorących udział w inicjacji i progresji raka piersi częstość nowych zachorowań stale rośnie. Uważa się że w najbliższych latach zachorowalność kobiet na raka piersi wzrośnie, zwłaszcza nowotworów piersi zależnych od otyłości, z 30 do 40%. (149) Wykazano, że w 2014 roku u 1,9 miliarda ludzi dorosłych na świecie zdiagnozowano nadwagę (BMI 25-29,9) a wśród nich aż u 600 milionów otyłość (BMI powyżej 30). (32) W przeprowadzonych badaniach wykazano, że wśród kobiet z województwa wielkopolskiego ze zdiagnozowanym rakiem piersi istotnie statystycznie częściej występowała nadwaga (BMI>25) i otyłość (BMI>30) niż u kobiet zdrowych z tego samego rejonu Polski. Co wpisuje się w ogólnopolskie jak i ogólnoświatowe statystyki, które wskazują otyłość jako jeden z najważniejszych czynników ryzyka rozwoju raka, także raka piersi. (30,150)

Postanowiono zatem, na podstawie wskaźnika BMI, określić odsetek zdrowych kobiet z województwa wielkopolskiego w wieku okołomenopauzalnym u których obserwuje się nadwagę i otyłość. Wykazano, że BMI wyższe niż 25 posiada 45% kobiet z tej populacji i wynik ten jest porównywalny z ogólnopolskimi statystykami. Z badań przeprowadzonych przez Instytut Żywności i Żywienia w Warszawie w roku 2014 wynika, że w tym czasie nadwagę i otyłość obserwowano u 46% populacji dorosłych kobiet w Polsce. (151) Analizując częstość występowania nadwagi i otyłości wśród kobiet z poszczególnych województw Polski można zauważyć, że u Wielkopolanek jest ona niższa niż np. u mieszkanków województwa łódzkiego (56%). (152) Nie zmienia to jednak faktu, że odsetek polek z nadmierną masą ciała stale rośnie i w 1996 roku wynosił 27,7% a w roku 2014 już 46% populacji. Obserwowany wzrost zachorowania na nowotwory, w tym także na raka piersi, może zatem wynikać m.in. ze zwiększonej masy ciała kobiet. Szacuje się, że każde obniżenie o 5 kg wagi ciała zmniejsza ryzyko zachorowania na raka piersi o 8%. (153) W związku z tym, że zdrowe otyłe kobiety mają znacznie wyższe stężenie leptyny w surowicy niż kobiety o prawidłowej masie ciała, (154,155), obniżenie ilości tkanki tłuszczowej warunkuje spadek wydzielania szeregu hormonów i białek. Zmniejszenie wagi ciała objawia się obniżeniem stężenia leptyny, TNF α , białek związanych z układem krzepnięcia (PAI-1, TF) i układem dopełniacza (adipsyna, adiponektyna) czy enzymów związanych z metabolizmem hormonów steroidowych. Wykazano, że leptyna poprzez modulowanie środowiska pozakomórkowego, w tym obniżenie zdolności komórek do

apoptozy czy indukcja ekspresji genów antyapoptotycznych, wielokierunkowo stymuluje komórki raka piersi do podziałów. (30) Możliwe zatem, że niższe stężenie hormonu we krwi wynikające z mniejszej ilości tkanki tłuszczowej zmniejsza ryzyko zachorowania na raka piersi. Aczkolwiek, u niektórych kobiet obserwuje się wysokie stężenie leptyny niezależne od ilości tkanki tłuszczowej. Wynika to najprawdopodobniej z nadmiernej ekspresji genu *LEP* lub zmian aktywności białka będących efektem polimorfizmów genu *LEP*.

Wpływ badanych polimorfizmów na masę ciała oraz częstość występowania polimorfizmów

LEP 2548G/A

Zaobserwowano, że u kobiet o prawidłowej masie ciała będących homozygotami polimorficznymi 2548AA obserwuje się wyższe stężenie leptyny niż u kobiet opisanych jako homozygoty dzikie 2548GG i heterozygoty 2548GA. (97,156) Postuluje się zatem, że polimorfizm 2548G/A genu kodującego leptynę – *LEP* może zaburzać syntezę białka i tym samym wpływać na ośrodek głodu i hamować łaknienie, przez co w zależności od genotypu korelować z otyłością. Jendakże w przeprowadzonych badaniach, podobnie jak w badaniach na populacji kobiet meksykańskich czy rumuńskich (91,157), nie wykazano różnic w częstości występowania polimorfizmu 2548G/A w grupie kobiet zdrowych o prawidłowej masie ciała oraz podwyższonej masie ciała (BMI>25). Nie wykazano także zależności pomiędzy otyłością, a badaniem polimorfizmem genu *LEP* u kobiet chorujących na raka piersi. Wykazano natomiast, że nadwaga i otyłość istotnie statystycznie częściej występują u kobiet z rakiem piersi niż u kobiet zdrowych.

Zależność otyłości od polimorfizmu wynika najprawdopodobniej z uwarunkowań populacyjnych a tym samym ze stylu życia, diety a także uwarunkowań społecznych i geograficznych czego efektem jest mniejsza wymiana puli genowej.

W populacji brazylijskiej i tajwańskiej allel G koreluje z otyłością (91,158) w przeciwieństwie do populacji pakistańskiej, w której forma polimorficzna AA koreluje nie tylko z otyłością ale także, co zaskakujące, z niskim stężeniem leptyny. W związku z tym sugeruje się, że polimorfizm ten może korelować ze wzrostem stężenia leptyny w surowicy krwi w sposób niezależny od zawartości tkanki tłuszczowej. (157)

Zauważono, że mimo braku istotnych różnic w częstości występowania formy polimorficznej 2548AA pomiędzy grupami otyłych i nieotyłych kobiet (16% vs. 17%) homozygoty polimorficzne 2548AA mają wyższe stężenie triglicerydów i niższe stężenie cholesterolu frakcji HDL zatem polimorfizm ten może korelować z występowaniem zespołu

metabolicznego i w konsekwencji otyłości. (96) Z drugiej jednak strony u dzieci to allel dziki G koreluje z wystąpieniem otyłości oraz ze zmianami w organizmie związanymi z otyłością tj. zwiększonym BMI, zwiększonym obwodem pasa, insulino-opornością oraz wzrostem stężenia leptyny w surowicy krwi. Jednocześnie zauważono, że wzrost stężenia leptyny u dzieci będących homozygotami dzikimi GG oraz heterozygotami GA koreluje z niższą ekspresją receptora leptynowego, opornością na leptynę i w konsekwencji wzrostem jej biosyntezy. (159) Takich zależności nie zaobserwowano u dorosłych, u których stężeniu triglicerydów, cholesterolu HDL i LDL nie jest zależne od genotypu (159,160) aczkolwiek forma dzika GG 2548 częściej występuje u osób bez zespołu metabolicznego a forma polimorficzna AA koreluje z wyższym stężeniem leptyny. (161)

Uważa się jednak, że mimo braku udziału polimorfizmu 2548G/A genu *LEP* w regulacji masy ciała kobiet z rejonu wielkopolski możliwe jest, że niezależna od ilości tkanki tłuszczowej produkcja leptyny może korelować z ryzykiem zachorowania na raka piersi. W przeprowadzonych badaniach oceniono częstość występowania genotypów polimorfizmu 2548G/A wśród kobiet zdrowych z województwa wielkopolskiego i wykazano, że forma dzika 2548GG występuje u 33% populacji, heterozygota 2548GA u 43,5%, a homozygota polimorficzna 2548AA u 23,5% populacji. Wyniki te są porównywalne z badaniami przeprowadzonymi wśród kobiet z województwa łódzkiego (AA – 28%) (160) a także w populacji ogólnopolskiej, wśród której częstość występowania poszczególnych genotypów wynosi odpowiednio 33,5%, 49% oraz 17,5% (162); podobnie jak w populacji słowackiej (32%, 44%, 24%) (163) czy tureckiej 30%, 49,5%, 20%) (90). Natomiast częstość występowania form dzikich GG jest o około 10% niższa w populacji meksykańskiej (23,4%; 55,2%; 21,4%) (164) oraz serbskiej (25,8%, 54,8%, 19,4%) (165). Natomiast w populacji chińskiej, mieszkanek Sri Lanki czy Iranu znacząco częściej obserwuje się allel polimorficzny A, odpowiednio: 60% (99), 66% (166) i 52% (109).

Obecność polimorfizmu 2548 G/A oceniono także w grupie kobiet z rejonu wielkopolski ze zdiagnozowanym rakiem piersi (GG 34%; GA 47%, AA 19%) i nie zaobserwowano, podobnie jak w populacji meksykańskiej (167), istotnej statystycznie zależności pomiędzy częstością poszczególnych genotypów w badanych grupach kobiet zdrowych i chorych. W populacji irańskiej natomiast wykazano, że obecność formy dzikiej koreluje z ryzykiem zachorowania na raka piersi bezpośrednio (u kobiet z rakiem piersi częstość AA 56,7; kobiety zdrowe AA 36,8) a także pośrednio, poprzez wpływ na wcześniejsze wystąpienie pierwszej miesiączki. (164)

LEPR 223Gln/Arg i 109Lys/Arg

Leptyna łączy się z receptorem leptynowym i w efekcie aktywuje wewnątrzkomórkowy szlak przekazywania sygnału z udziałem kinazy JAK i czynników transkrypcyjnych STAT. W efekcie, w zależności od miejsca występowania receptora, hamuje odczuwanie głodu, reguluje podziały komórkowe czy wydzielanie hormonów. Jednakże wykazano, że odpowiedź receptora może być różna, zależna od jego budowy, zmian w poziomie leptyny czy jej siły wiązania z receptorem. Te zmiany struktury, funkcji bądź poziomu poszczególnych białek mogą wynikać z obecności polimorfizmów w genie leptyny bądź receptora leptynowego. (95) Wśród polimorfizmów, które, jak się wydaje, mają największe znaczenie kliniczne wymieniane są: zamiana glutaminy na argininę w pozycji 223 (223Gln/Arg) oraz substytucja lizyny argininą w pozycji 109 (109Lys/Arg) receptora leptynowego. Postuluje się, że w efekcie tych zmian dochodzi do zmniejszonej zdolności przyłączania się leptyny do receptora, oporności na leptynę i w efekcie wzrostu poziomu tego białka. Podwyższony poziom leptyny przy prawidłowo działającym sprzężeniu zwrotnym powinien zmniejszyć łaknienie i w efekcie obniżyć ilość tkanki tłuszczowej. W przeprowadzonych badaniach nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmó 223Gln/Arg oraz 109 Lys/Arg genu *LEPR* wśród kobiet zdrowych o prawidłowej i nieprawidłowej (BMI > 25) masie ciała. Nie wykazano także wpływu polimorfizmu 223Gln/Arg na masę ciała kobiet chorych na raka piersi. Wykazano natomiast, że homozygoty polimorficzne 109Arg/Arg występują istotnie statystycznie częściej u kobiet z rakiem piersi o prawidłowej masie ciała niż u kobiet z nadwagą i otyłością. Możliwe zatem, że obecność argininy w sekwencji receptora leptynowego powoduje zmianę struktury receptora leptynowego i tym samym utrudnione przyłączanie się leptyny. Konsekwencją takiego zjawiska może być oporność na leptynę i wzrost jej stężenia co w efekcie prowadzić może do inicjacji procesu nowotworowego. Jednakże Hastuti 2016 u kobiet zdrowych Indonezyjek wykazał zależność pomiędzy obydwoma polimorfizmami, a otyłością. Homozygoty polimorficzne 109Arg/Arg są bardziej otyłe względem homozygot dzikich 109Lys/Lys i mają wyższe stężenie leptyny. (101) Ponadto, otyłe kobiety scharakteryzowane jako homozygoty polimorficzne pod względem obydwu polimorfizmów mają znacznie wyższe stężenie leptyny niż homozygoty dzikie i heterozygoty (223Gln/Gln+Gln/Arg 26,8 ng/ml vs. Arg/Arg 27,26ng/ml; 109Lys/Lys+Lys/Arg 26ng/ml vs. 33,49 ng/ml). (101) Jednakże Furusawa i wsp, wykazali, że tylko forma heterozygotyczna 223Gln/Arg koreluje ze znaczącym wzrostem masy ciała wśród kobiet z wysp Salomona (p=0,0009). Nie wykazano zależności między polimorfizmem

2548G/A *LEP* i 109 Lys/Arg *LEPR* a masą ciała. (168) Różnice te najprawdopodobniej wynikają z charakterystyki grupy badanej i różnic populacyjnych.

Analiza statystyczna rozkładu genotypów polimorfizmów genu *LEPR* (223Gln/Arg oraz 109Lys/Arg) w populacji kobiet z województwa wielkopolskiego wykazała, że form dzikich 223Gln/Gln występuje 30% tej populacji, heterozygot 223Gln/Arg 47,5% a homozygot polimorficznych 223Arg/Arg 22,5%. Natomiast w przypadku polimorfizmu 109Lys/Arg częstość homozygot dzikich 109Lys/Lys 50,5%, heterozygot 109Arg/Arg 37% a homozygot polimorficznych 12%. A w omawianych wcześniej badaniach na grupie kobiet z Wysp Salomona wyniki znacząco się różnią. W populacji tej nie występuje forma dzika 223 Gln/Gln (0%) a dominuje forma polimorficzna 223Arg/Arg (84%). Natomiast jako formę dziką 109Lys/Lys opisano 9,9% populacji kobiet a jako heterozygoty 109Lys/Arg i homozygoty polimorficzne 109Arg/Arg odpowiednio 47,6% i 42,4%. (168) Podobne zależności obserwuje się w populacji Chińskiej w której także dominuje forma polimorficzna 223Arg/Arg której występowanie obserwuje się u około 79% populacji przy 1% częstości formy dzikiej 223Gln/Gln. Podobne rozbieżności obserwuje się analizując częstość polimorfizmu 109Lys/Arg. Forma polimorficzna występuje u około 70% populacji a forma dzika u 5%. (169,170) W populacji irańskiej natomiast częstość formy dzikiej była porównywalna i wynosiła 49% (171) a w badaniach prowadzonych w populacji egipskiej forma dzika występuje częściej (56% i 60%) (172,173).

ABCB 3435C/T i 2677G/A,T

Etiologia otyłości jest procesem złożonym i wynika nie tylko z regulacji ośrodka głodu w podwzgórzu ale także z nieprawidłowej funkcji białek odpowiedzialnych za usuwanie substancji odżywczych z komórek. Wykazano, że u myszy z dysfunkcyjnym białkiem ABCB1 występuje otyłość, która wynika najprawdopodobniej z nadmiernej kumulacji substancji odżywczych. (174) W badaniach na szczurach wykazano, że poziom białka ABCB1 w jelicie cienkim otyłych szczurów jest znacznie niższy niż u szczurów nieotyłych. (175) Zależność ta wynika najprawdopodobniej z tego, że białko ABCB1 uczestniczy przede wszystkim w przezłonowym transporcie ksenobiotyków a także cukrów, tłuszczów, aminokwasów czy hormonów steroidowych. (117) Zatem w wyniku spadku ilości bądź aktywności białka dochodzi do kumulacji substancji odżywczych w organizmie i w konsekwencji do otyłości.

Podczas analizy poziomu ekspresji genu *ABCB1* w ośrodkowym układzie nerwowym u ludzi wykazano, że obniżona ekspresja genu *ABCB1* koreluje z wyższą masą ciała

zdrowych Amerykanów oraz Afroamerykanów. Przy czym zależność ta u Afroamerykanów jest bardziej wyrażona i BMI jest o 1,3 raza wyższe niż u Amerykanów (176). Jednakże mechanizm regulacji wagi ciała wynikający z ekspresji *ABCB1* jest jeszcze nieznan. Możliwe, że polimorfizmy genu *ABCB1*, których efektem jest zmiana aktywności bądź ilości białka może korelować z otyłością. Tym bardziej, że białko ABCB1 odpowiada także za reabsorpcję i redystrybucję cholesterolu w jelicie cienkim. Wykazano, że u osób będących homozygotą polimorficzną 3435TT poziom cholesterolu HDL jest wyższy (177) przy jednoczesnym spadku stężenia cholesterolu LDL i triglicerydów (178). Wzrost aktywności białka ABCB1 wynikający z ekspozycji na leki z grupy statyn, będących jednocześnie substratem dla ABCB1, u homozygot polimorficznych 3435TT powoduje spadek stężenia cholesterolu HDL. (179) Uważa się także, że polimorfizm 2677G/A,T może korelować z otyłością. W populacji japońskiej wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy polimorfizmem 2677 G/A,T a otyłością zarówno u mężczyzn jak i kobiet. Jednocześnie wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy polimorfizmem 2677 G/A,T a BMI mężczyzn. Podobnej zależności nie zaobserwowano u kobiet. Może to wynikać z innego statusu hormonalnego kobiet i mężczyzn. Hormony steroidowe są substratem białka ABCB1 i w związku z tym mogą regulować jego aktywność i tym samym odpowiadać za zmiany BMI osób badanych. (180) W przeprowadzonych badaniach na populacji kobiet z rejonu wielkopolski także oceniono zależność pomiędzy polimorfizmami 3435C/T oraz 2677G/A,T genu *ABCB1* a nadwagą i otyłością. Nie zaobserwowano jednak istotnych statystycznie różnic pomiędzy częstością występowania otyłości i nadwagi w grupach kobiet zdrowych i chorych na raka piersi o różnych genotypach genu *ABCB1*. Postanowiono zatem ocenić populacyjną częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmów genu *ABCB1* i wykazano, że polimorfizm 3435C/T występuje w populacji kobiet z rejonu Wielkopolski z podobną częstością (CC 25%, 50,5% i 24,5%) jak wśród kobiet z województwa mazowieckiego (CC 24,5%, CT 55,5%, TT 20%; (181)) oraz u kobiet w populacji ogólnopolskiej (CC 20,7%, CT 56,1, TT 23,2 (132)). Podobne wyniki uzyskano analizując częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 3435C/T genu *ABCB1* w populacji bośniackiej (182), chorwackiej (183), włoskiej (184) czy niemieckiej i czeskiej (185). Wynika to najprawdopodobniej z rozmieszczenia geograficznego Polski. Analizując częstość występowania omawianego polimorfizmu w populacji hinduskiej wykazano natomiast, że w populacji pozaeuropejskiej allel dziki CC oraz forma heterozygotyczna występują znacznie rzadziej (odpowiednio 18% i 47,3%), a forma polimorficzna TT częściej (34,7%). (186)

Wydaje się także, że częstość występowania alleli polimorfizmu 2677G/A,T także jest zależna od populacji. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że poszczególne genotypy w populacji kobiet z województwa wielkopolskiego występują z częstością: GG 33,5%, G/T,A 50% i homozygot polimorficznych T,A/T,A 16,5%. Ze względu na rzadkie występowanie allelu A wyniki przedstawiono jako sumę obydwu alleli polimorficznych A i T. Wyniki te odbiegają od badań przeprowadzonych na populacji ogólnopolskiej, w której homozygoty dzikie występują u 25,6% populacji, a homozygoty polimorficzne u 12%. (132) Analizując częstość występowania dzikiego allelu G w populacji pozaeuropejskiej (irańskiej) także zaobserwowano znaczne różnice. Allel G w populacji tej występuje u 82,5% populacji, a homozygota GG u 65%. (187)

Polimorizmy badanych genów a ryzyko zachorowania na raka piersi

Inicjacja procesu nowotworowego jest procesem złożonym i zależnym od wielu czynników. Jednym z ważniejszych w kontekście zachorowania na raka piersi jest ilość tkanki tłuszczowej i tym samym status hormonalny kobiety. Jednym z hormonów produkowanych przez tkankę tłuszczową jest leptyna, która z jednej strony wydzielana jest przez tkankę tłuszczową, a z drugiej strony hamuje ośrodek głodu i tym samym zmniejsza ilość tkanki tłuszczowej a w konsekwencji stężenia leptyny. (188) W przeprowadzonych badaniach wykazano, że grupa kobiet z rakiem piersi ma wyższą masę ciała niż kobiety zdrowe i w konsekwencji najprawdopodobniej wyższe stężenie leptyny. Leptyna jest jednym z czynników indukujących stan zapalny poprzez wzmaganie produkcji szeregu cytokin i w związku z tym jest jednym z czynników ryzyka wystąpienia raka piersi. Ponadto, leptyna stymuluje komórki gruczołu piersiowego do proliferacji bezpośrednio oraz pośrednio, wzmagając aromatyzację estrogenu. Wydaje się zatem, że wzrost ilości leptyny wynikający z nadmiaru tkanki tłuszczowej jest istotnym czynnikiem ryzyka raka piersi. Wykazano jednak, że ilość leptyny w surowicy krwi nie zawsze jest zależna od ilości tkanki tłuszczowej, a od polimorfizmów genów kodujących leptynę oraz receptor leptynowy.

LEP 2548G/A

Polimorfizm 2548 znajduje się w promotorze genu *LEP* i z tego względu jego obecność może wpływać na poziom ekspresji genu i tym samym na poziom leptyny, która poprzez wpływ na ośrodek głodu reguluje łaknienie. Postuluje się, że polimorfizm genu *LEP* koreluje ze zwiększoną masą ciała i tym samym pośrednio ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka piersi. Jednakże w przeprowadzonych badaniach nie wykazano istotnych

statystycznie różnic pomiędzy częstością występowania polimorfizmu 2548 G/A genu *LEP* w grupie kobiet z rakiem piersi a kobiet zdrowych z rejonu województwa wielkopolskiego. Częstość występowania homozygot polimorficznych AA w grupie kobiet z rakiem piersi wynosiła 19% a wśród kobiet zdrowych 23,5%. Podobnie jak w badaniach prowadzonych przez Mendez-Hernandez i wsp., gdzie nie wykazano znaczących różnic w częstości występowania polimorfizmu 2548G/A wśród kobiet chorujących na raka piersi oraz kobiet zdrowych,

a także udziału tego polimorfizmu w odpowiedzi na leczenie. Kobiety, które odpowiedziały na terapię przeciwnowotworową w 34% charakteryzują się obecnością formy dzikiej 2548GG a wśród kobiet, które nie odpowiedziały na leczenie 37,5% stanowiła forma dzika. (110) Natomiast w populacji irańskiej zaobserwowano wzrost zachorowania na raka piersi kobiet z formą dziką G/G. Ponadto, kobiety z rakiem piersi będące homozygotami polimorficznymi miały prawie dwukrotnie wyższe stężenie leptyny w surowicy niż kobiety zdrowe o takim samym genotypie (68+/-45ng/ml vs. 34+/-25ng/ml). Różnice te wynikają najprawdopodobniej z tego, że w populacji irańskiej allel traktowany w populacji europejskiej jako polimorficzny, występuje u większości populacji (52%). (109) Do podobnych wniosków doszli Huerta i wsp. analizując udział polimorfizmu 2548G/A w zachorowaniu na raka piersi kobiet w wieku przedmenopauzalnym. Forma dzika GG u kobiet u których zdiagnozowano raka piersi przed wystąpieniem menopauzy (wiek 36,4 +/- 6,8) występowała istotnie statystycznie rzadziej niż u kobiet zdrowych (22% vs. 32%, p=0.04). (92) Wynika to najprawdopodobniej z wyższego stężenia leptyny u osób będących homozygotami polimorficznymi.

LEPR 223Gln/Arg i 109Lys/Arg

Leptyna łącząc się z receptorem leptynowym znajdującym się w największym stężeniu w podwzgórzu hamuje ośrodek głodu, co w efekcie doprowadza do obniżenia masy tkanki tłuszczowej i w konsekwencji zmniejszenia stężenia leptyny. Zaburzenie sprzężenia wynikające np. ze spadku poziomu receptora leptynowego lub zmiany jego struktury może wpływać na pulę leptyny i tkanki tłuszczowej a w efekcie warunkować kancerogenezę. Możliwe zatem, że polimorfizmy genu receptora leptynowego korelują z ryzykiem zachorowania na raka piersi. Przeprowadzono zatem analizę częstości występowania dwóch polimorfizmów genu *LEPR*: 109 Lys/Arg i 223 Gln/Arg w grupie kobiet z rakiem piersi i zdrowych z rejonu województwa wielkopolskiego. Częstość występowania formy polimorficznej 109Arg/Arg w grupie kobiet zdrowych i kobiet chorujących na raka piersi była

porównywalna i wynosiła odpowiednio 12,5% oraz 9%. Badania te przeprowadzono na grupie kobiet w wieku około menopauzalnym (grupa kontrolna 57,8 +/- 8,2 lat; grupa badana 59,6 +/- 11 lat), a w badaniach przeprowadzonych przez Liu CR i wsp. wykazano, że homozygoty polimorficzne 109Arg/Arg mają większe ryzyko zachorowania na raka piersi w wieku przedmenopauzalnym. Ponadto współwystępowanie formy polimorficznej AA2548, Arg/Arg 109 i otyłości znacząco zwiększało ryzyko zachorowania na raka piersi w wieku przedmenopauzalnym. (108)

W przeprowadzonych badaniach wykazano natomiast, że obecność allelu polimorficznego 223Arg/Arg koreluje z mniejszym ryzykiem zachorowania na raka piersi. U kobiet zdrowych istotnie statystycznie częściej występuje allel polimorficzny 223Arg/Arg niż u kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi. Nie wykazano natomiast, różnic w częstości występowania allelu dzikiego 223Gln w populacji kobiet zdrowych i chorych z rejonu Wielkopolski. Jednakże badania prowadzone przez El-Hissiny i wsp. oraz Han i wsp. wykazały, że allel dziki Gln koreluje ze wzrostem zachorowania na raka piersi. Homozygoty dzikie 223Gln/Gln występują istotnie statystycznie częściej w grupie kobiet chorych niż w grupie zdrowych Egipcjanek (18,8% vs. 4,2%) (189) a także Chinek (13,7% vs. 2,3%) (190). Zależność ta może wynikać z różnic w populacyjnym rozmieszczeniu allelu dzikiego, który w populacji polskiej występuje u 30% kobiet, a wśród Egipcjanek i Chinek wynosi odpowiednio 4,2% i 2,37%. (189,190) Korelacja ta może wynikać z obserwowanego u homozygot dzikich (223Gln/Gln) wyższego stężenia leptyny będącego najprawdopodobniej efektem zmian w strukturze receptora i oporności na leptynę.

Z drugiej jednak strony kobiety będące homozygotami dzikimi 223Gln/Gln mają mniejsze utkanie gruczołu piersiowego przez co mniejsze ryzyko rozwoju raka piersi. (191) Otyłe kobiety będące homozygotami polimorficznymi 223Arg/Arg częściej chorują na typ luminalny B nowotworu piersi, który ma gorsze rokowania niż typ luminalny A. (192) Wskazuje się także na zależność pomiędzy homozygotami dzikimi 223 Gln/Gln a zespołem metabolicznym objawiającym się wzrostem parametrów krwi tj, leptyny, insuliny, cholesterolu LDL, glukozy, oraz spadkiem poziomu cholesterolu HDL. (191) Postuluje się zatem, że polimorfizmy genów kodujących leptynę oraz receptor leptynowy mogą korelować z otyłością i przez to zwiększać ryzyko rozwoju nowotworu piersi.

Wydaje się więc, że nie tyle polimorfizmy genów *LEP* i *LEPR* korelują ze wzrostem zachorowania na raka piersi a wzrost stężenia leptyny wynikający z otyłości bądź ze wzmożonej ekspresji genu *LEP* lub *LEPR*. Badania na liniach komórkowych raka piersi MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3, BT-474, ZR-75-1 dowiodły, że wykazują one wysokie

poziomy leptyny oraz receptora leptynowego. Z kolei stężenie leptyny jest zależne od genotypu i w komórkach będących homozygotą polimorficzną 2548AA jej poziom jest wyższy niż w komórkach linii opisanych jako homozygoty dzikie GG i heterozygoty GA. Może to wynikać z działania czynników transkrypcyjnych zależnych od insuliny m.in. Sp1, który przyłącza się w miejscu polimorfizmu 2548G/A i indukuje ekspresję genu. (193)

ABCB 3435C/T i 2677G/A,T

Jednym z czynników mogących sprzyjać rozwojowi raka piersi jest kumulacja w komórce substancji szkodliwych, za których usuwanie odpowiada m.in. białko ABCB1. Białko to należy do nadrodziny białek ABC i kodowane jest przez gen *ABCB1*. Usytuowane jest w błonie komórkowej, dzięki czemu usuwa z komórki do przestrzeni zewnątrzkomórkowej endogenne i egzogenne substancje hydrofobowe zabezpieczając komórkę przed ich toksycznym działaniem. Aktywność oraz pula białka, a tym samym jego efektywność, może być zależna od polimorfizmów obecnych w genie *ABCB1*. (194)

Postanowiono zatem ocenić udział dwóch polimorfizmów skutkujących: zamianą cytozyny na tyminę w pozycji 3435 oraz guaniny na adeninę bądź tyminę w pozycji 2677 w ryzyku zachorowania na raka piersi. Analizę występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 3435 C/T oraz 2677G/A,T genu *ABCB1* przeprowadzono u 202 kobiet grupy kontrolnej oraz 209 kobiet chorych na raka piersi. Wszystkie kobiety pochodziły z rejonu województwa wielkopolskiego a średnia wieku kobiet zdrowych i chorych wynosiła odpowiednio 57,8 +/- 8,2 lat i 59,6 +/- 11. Częstość występowania polimorfizmu 3435C/T oraz 2677G/A,T u kobiet zdrowych wynosiła odpowiednio 25% i 33,5% a u kobiet chorujących na raka piersi odpowiednio 23% i 43%. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych zależności pomiędzy częstością występowania 3435C/T oraz 2677G/A,T w grupie kobiet zdrowych oraz chorych. (124)

Podobne wyniki uzyskano w populacji marokańskiej gdzie częstość występowania formy polimorficznej 3435TT u kobiet zdrowych wynosiła 10,3% a u kobiet chorych 16,7% i różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0,61$). (195) Jednakże badania przeprowadzone w populacji kobiet tureckich i słowackich wskazują na udział formy polimorficznej 3435TT w procesie rozwoju raka piersi (Turcja TT: kobiety chore 29,8%, kontrola 18% $p=0,013$, Słowacja TT: kobiety chore 29%, zdrowe 19%, $p=0,02$). (126,128) Z drugiej jednak strony wykazano, że w populacji kobiet meksykańskich większym ryzykiem zachorowania na raka piersi obarczone są kobiety będące homozygotami dzikimi 3435CC i heterozygoty 3435CT.

Częstość występowania tych genotypów u kobiet z rakiem piersi wynosi 32,8% a u kobiet zdrowych 21%, $p=0,001$. (196)

Różnice w wynikach opisujących udział polimorfizmu 3435C/T w procesie zachorowania na raka piersi mogą wynikać ze współdziałania czynników molekularnych i środowiskowych. W zależności od rozmieszczenia geograficznego każda populacja narażona jest na działanie czynników chemicznych/ksenobiotyków. Wykazano, że obecność formy polimorficznej 3435TT koreluje z niższą aktywnością białka ABCB1 w jelicie, co w efekcie może wywoływać utrudnione wydalanie substancji toksycznych. Tak więc w populacji żyjącej w rejonie zanieczyszczonym może mieć to niekorzystny efekt. Z drugiej strony niższa aktywność ABCB1 w jelicie może mieć korzystny wpływ na leczenie istniejącego już nowotworu. U pacjentek z rakiem piersi będących homozygotami polimorficznymi 3435TT obserwuje się wyższe stężenie leków (docetaksel i doksorubicyna) i tym samym dłuższe przeżycie pacjentów. Jednocześnie forma polimorficzna koreluje dodatkowo z negatywnymi efektami ubocznymi tj. biegunka, wymioty, neutropenia.(140) Z drugiej jednak strony wyższa aktywność ABCB1 koreluje z dłuższym czasem przeżycia. (197)

Zarówno sama forma polimorficzna 3435TT jak i haplotyp 3435T-1236T-2677T koreluje z zachorowaniem na raka piersi oraz odpowiedzią na leczenie przeciwnowotworowe w populacji chińskiej. (138) W związku z tym, możliwe, że polimorfizm 2677 G/A,T uczestniczy w regulacji aktywności białka ABCB1 i w konsekwencji przyczynia się do inicjacji nowotworowej. Analiza udziału polimorfizmu 2677G/A,T w badanych grupach kobiet nie wykazała jednak zależności pomiędzy poszczególnymi allelami a zwiększonym zachorowaniem na raka piersi. Częstość poszczególnych genotypów w grupie kobiet chorych na raka piersi wynosi GG 43%, GT,A 44%, T,AT,A 13% a w grupie kobiet zdrowych GG 33,5%, GT,A 50%, T,AT,A 16,5% (GG vs. GT,A+T,A/T,A, $p=0,071$; GG+G/T,A vs. T,AT,A, $p=0,7573$). (124) Natomiast u mieszkank Ammanu wykazano korelację pomiędzy formą dziką 2677GG a częstością zachorowania na raka piersi. U kobiet z rakiem piersi poszczególne genotypy obserwowano z częstością GG 43,1%, GT+GA 50,9%, AA+TT 6%. U kobiet zdrowych natomiast odpowiednio 29,6%, 50,9% i 19,4%. (198) Z drugiej jednak strony Wu i wsp. wykazali, że jednak allel T o 1,83 krotnie zwiększa ryzyko zachorowania na raka piersi. (138)

Polimorfizmy badanych genów a ekspresja receptorów estrogenowych (ER), progesteronowych (PgR) i naskórkowego czynnika wzrostu (HER2).

LEP 2548G/A; LEPR 223Gln/Arg i 109Lys/Arg

Wyniki badań wskazują na współdziałanie leptyny i estrogenów w rozwoju gruczołu piersiowego czy aktywności hormonalnej jajników. Ponadto, leptyna powoduje aromatyzację androgenów do estrogenu co w efekcie powoduje istotnie mniejsze stężenie testosteronu związane z wysokim poziomem leptyny. (199) Z drugiej strony 17beta-estradiol (E2) koreluje ze wzrostem ekspresji genu *LEP* w tkance tłuszczowej. Ponadto E2 moduluje ekspresję receptora leptynowego prawdopodobnie poprzez regulację promotora genu *LEPR*. (81) W badaniach na liniach komórkowych wykazano, że leptyna wzmacnia proliferację estrogenozależnych komórek raka piersi (MCF7), w przeciwieństwie do komórek ER- (MDA-MB-231), u których nie zaobserwowano tej zależności. Z kolei w badaniach na zwierzętach zauważono, że podawanie leptyny przez 13 tygodni skutkuje dwukrotnym wzrostem guza w porównaniu do zwierząt traktowanych estradiolem. (200) Sugeruje to udział leptyny zarówno w regulacji ekspresji receptora leptynowego jak i progresji nowotworu piersi. (201) Możliwe zatem, że zależna od polimorfizmu genu *LEP* zmiana stężenia leptyny może wpływać na wzrost ryzyka zachorowania na raka piersi. Jednakże przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w częstości występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 2548G/A genu *LEP* w grupie kobiet z nowotworem piersi z ekspresją receptora estrogenowego oraz z jej brakiem. Warto jednak zaznaczyć, że zaobserwowano wyższe stężenia leptyny zarówno u kobiet z ekspresją ER ale i PgR, względem kobiet bez ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych. (109) W niniejszej pracy postanowiono zatem ocenić zależność pomiędzy obecnością polimorfizmu 2548G/A genu *LEP* a ekspresją receptorów progesteronowych na powierzchni komórek raka piersi. Jak wykazano, obecność formy dzikiej GG koreluje z ekspresją receptora progesteronowego. Jest to zjawisko niekorzystne ponieważ obecność receptorów progesteronowych na powierzchni komórek sprzyja rozwojowi nowotworu i skracają czas przeżycia pacjentki.

Co ważne, leptyna indukuje ekspresję białek szoku termicznego Hsp90 i tym samym wzmacnia ekspresję i dimeryzację HER2, co w efekcie zmniejsza efektywność terapii tamoksifenem. Ponadto analiza fosforylacji HER2, Akt i MAPK wykazała wzrost proliferacji komórek raka piersi eksponowanych na działanie leptyny. (202) Postuluje się zatem, że polimorfizm genu *LEP* może korelować z ekspresją receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu HER2. Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała jednak zależności pomiędzy poszczególnymi allelami polimorfizmu 2548G/A, a ekspresją receptora HER2. Częstość występowania alleli GG w grupie kobiet z dodatnim wynikiem HER2 wynosiła 26%, alleli GT 53% natomiast alleli polimorficznych AA 21%. W grupie kobiet, u których

nie wykazano ekspresji receptora HER2 wyniki te były porównywalne i wynosiły GG 30%, GA 53%, AA 17%. W badaniach *in vivo* zaobserwowano natomiast, że współwystępowanie wysokiej ekspresji leptyny oraz receptora leptynowego wzmacnia aktywność HER2 i zmniejsza wrażliwość na działanie leczenia przeciwciałami anti-HER2 (tamoksifen). (203) Możliwe zatem, że nie polimorfizm genu *LEP* lub polimorfizmy genu receptora leptynowego, których efektem może być wzrost ekspresji receptora, mogą korelować z występowaniem receptora HER2 na powierzchni komórek raka piersi. Przeprowadzona analiza statystyczna rozkładu alleli polimorfizmów 223Gln/Arg i 109Lys/Arg genu *LEPR* w grupie kobiet z rakiem piersi z województwa wielkopolskiego wykazała, że forma dzika polimorfizmu 223Gln/Gln istotnie statystycznie częściej występuje u kobiet, u których histopatologiczna ocena guza nie wykazała obecności receptora HER2, a forma polimorficzna 223Arg/Arg koreluje z ekspresją HER2. Żadna z dostępnych pozycji literaturowych nie wskazuje na taką zależność. W jendnej z dostępnych prac obejmujących badania populacji egipskiej nie wykazano zależności pomiędzy 223Gln/Arg, a ekspresją receptorów estrogenowych, progesteronowych i HER2. (105) Różnice te mogą wynikać z różnic populacyjnych. Tym samym przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań wymagają rozszerzenia na populację ogólnopolską. Nie zaobserwowano takiej zależności w przypadku polimorfizmu 109Lys/Arg a także nie zaobserwowano współwystępowania receptora leptynowego z ER i PgR (204) na powierzchni komórek nowotworowych. W badanej grupie kobiet nie wykazano także zależności pomiędzy polimorfizmami 223Gln/Arg i 109Lys/Arg a obecnością ER i PgR.

ABCB1 3435C/T i 2677G/A,T

Wzrost ilości oraz aktywności receptora HER2 może korelować z ekspresją genu *ABCB1*. W badaniach na komórkach linii raka piersi (BT-474) z indukowaną nadekspresją genu *ABCB1* wykazano, że wzrost ilości białka ABCB1 koreluje ze wzrostem ilości i aktywności receptora HER2. (205) Z kolei niski poziom ABCB1 w komórkach guza koreluje z brakiem ekspresji ER, PgR, HER2 i tym samym krótszym czasem przeżycia. (197) Możliwe zatem, że wzrost ekspresji genu *ABCB1*, będący efektem polimorfizmów genu, także koreluje z nadekspresją HER2 i w efekcie pogarsza rokowanie. Jednakże Turgut i wsp. 2006 wykazali, że nie ma zależności pomiędzy polimorfizmem 3435 C/T a stopniem zaawansowania choroby nowotworowej i ekspersją ER, PgR i HER2. (128) Podobne wnioski wysunięto analizując zależność pomiędzy polimorfizmami 3435C/T oraz 2677G/A,T a ekspresją receptorów estrogenowych, progesteronowych i naskórkowego czynnik

a wzrostu w grupie kobiet z rakiem piersi z województwa wielkopolskiego. W grupie kobiet z z ekspresją receptora estrogenowego i progesteronowego 24% to homozygoty dzikie 3435CC a 45% homozygoty dzikie 2677GG. Natomiast wśród kobiet charakteryzujących się brakiem receptora estrogenowego i progesteronowego w tkance nowotworowej 27% opisano jako 3435CC a 37% jako 2677GG.

W populacji słowackiej wykazano jednak, że forma polimorficzna 3435TT częściej występuje u pacjentek w niższym stopniu zróżnicowania nowotworu (Grade 1 i 2) oraz z mniejszą częstością w stopniu G3 ($p=0,006$). Jednocześnie nie wykazano zależności pomiędzy tym polimorfizmem 3435C/T a pozostałymi parametrami histologicznymi tj. wielkością guza pierwotnego, obecnością przerzutów odległych i przerzutami do okolicznych i odległych węzłów chłonnych. (126) Z kolei w populacji chińskiej oceniono udział dwóch polimorfizmów genu *ABCB1* (3435C/T i 2677G/A,T) w różnicowaniu nowotworu i nie wykazano istotnej statystycznie zależności. (138) Wyniki przedstawione w niniejszej pracy także nie wskazują na udział omawianych polimorfizmów w różnicowaniu się nowotworu piersi, ich udziału w przerzutowaniu do narządów odległych i węzłów chłonnych a w konsekwencji stopnia zaawansowania choroby nowotworowej.

Analiza ilości białka ABCB1 in vitro

Komórki linii MCF7 i MDA-MB-231 są odpowiednio modelowymi komórkami estrogenozależnego i estrogenoniezależnego raka piersi. W komórkach tych linii oceniono ekspresję szeregu receptorów oraz białek, aczkolwiek dostępne publikacje niejednoznacznie odnoszą się do poziomu oraz aktywności białka ABCB1 w tych liniach. Przedstawiona w pracy analiza puli białka ABCB1 w obydwu liniach komórkowych wykazała, że komórki linii MDA-MB-231 charakteryzują się znacznie niższą względem komórek linii MCF7 ekspresją ABCB1. Wyniki te są zaskakujące ponieważ w badaniach Li i wsp. oceniono ilość ABCB1 w komórkach linii MCF7 i wykazano, że zarówno ekspresja genu jak i ilość białka jest na niskim poziomie i wzrasta dopiero po indukowanej docetaksem oporności. (206) W pracy tej nie podano jednak ilości białka jaką nałożono w żel poliakrylamidowy, zatem trudno jest bezpośrednio odnosić się do przedstawionych wyników. Jednakże oceniając białko metabolizmu podstawowego (β -aktyna), stanowiącego kontrolę ilości nałożonego białka, można wnioskować, że nałożono nie mniejszą ilość białka niż 20 μ g. Choć i to wrażenie może być mylące w świetle braku informacji o czasie ekspozycji oraz ilości użytych przeciwciał. W badaniach przedstawianych przez Li i wsp. hodowlę komórek linii MCF7 prowadzono przez 72 godziny, bez podania ilości pasaży jakim były poddane komórki, co jak się wydaje

może mieć wpływ na sędzię ilości białek błonowych m.in. ABCB1. (206) W kolejnych badaniach, w których wykorzystano komórki linii MCF7 i MDA-MB-231 jako modelowe wykazano brak białka ABCB1 w błonie komórkowej (207,208) lub, przeciwnie do wyników przedstawionych w nieniejszej pracy, poziom ABCB1 w komórkach linii MDA-MB-231 jest wyższy niż w komórkach MCF7 (209). Jednakże w badaniach tych także nie podano ilości białka jaką poddano analizie oraz długości czasu hodowli. Nie podano także ile razy wykonano pasaż, co może mieć istotny wpływ na genotyp oraz fenotyp komórek. Według znanych standardów propagowanych m.in. przez ATCC im większa ilość pasażu tym bardziej zmienia się morfologia komórek, odpowiedź na czynniki transkrypcyjne, zmniejsza się efektywność transfekcji czy ekspresja genów. Wykazano, że w komórkach linii Caco-2 o wysokiej liczbie pasażu efektywność transfekcji genem *GFP* wzrasta, a w komórkach MCF7 spada względem komórek o niskiej liczbie pasażu. W związku z tym ATCC zaleca, jako modelowe, wykorzystywać komórki które pasażowano mniej niż 35 razy. (210) Ponadto, standardy hodowli komórek, w celu zabezpieczenia komórek przed infekcją, dopuszczają wykorzystanie pożywki hodowlanej z dodatkiem zestawu antybiotyków. Jednakże informacji opisujących wpływ tych antybiotyków na genotyp komórek jest niewiele. W badaniach na komórkach linii HepG2, których hodowlę prowadzono z dodatkiem penicyliny i streptomycyny wykazano zmianę w ekspresji 209 genów z czego ekspresja 157 genów wzrosła a 52 spadła. Wykazano wzrost ekspresji genów uczestniczących w procesie apoptozy, odpowiedzi na leki czy stresu nitrozacyjnego. (211) Ponadto wśród substratów dla białka ABCB1 znajdują się antybiotyki aminoglikozydowe (m.in. streptomycyna) co w wyniku długotrwałej ekspozycji komórek na ich działanie może skutkować zmianą ekspresji bądź aktywności białka. Wykazano również, że za oporność bakterii gram+ na szereg antybiotyków, w tym amino glikozydowych, odpowiada wzrost poziomu białka MsrA, będącego homologiem białka ABCB1 należącym do rodziny białek ABC. (212)

Wyniki badań przedstawione w nieniejszej pracy opierają się na eksperymentach przeprowadzonych na komórkach pozyskanych z ATCC i hodowanych zgodnie z wytycznymi ATCC. Ponadto do hodowli wykorzystano komórki linii MCF7 i MDA-MB-231, zweryfikowane pod względem potencjalnej infekcji mykoplazmą, jako pożywkę hodowlaną używano podłoże RPMI-1640 bez dodatku antybiotyku a komórki były poddane nie więcej niż 25 pasażom. Dlatego też wyniki te można uznać za przeprowadzone w rekomendowanych i wystandaryzowanych warunkach.

W dalszych etapach pracy postanowiono ocenić testem MTT wrażliwość komórek linii MCF7 i MDA-MB-231 na działanie doksorubicyny. Wykazano, że komórki linii MCF7

charakteryzujące się większą ilością białka ABCB1 są mniej wrażliwe na dokсорubicynę (IC₅₀ 24h 3,8 μM +/- 0,6; 48h 2,56 μM +/- 0,43). Natomiast komórki linii MDA-MB-231 z bardzo niską ilością ABCB1, u których najprawdopodobniej dochodzi do kumulacji dokсорubicyny w komórce są bardziej wrażliwe na działanie tego leku (IC₅₀ 24h 2,75 μM +/- 0,65; 1,47 μM +/- 0,35). Po 72 godzinach inkubacji z dokсорubicyną przeżywalność komórek obydwu linii jest na podobnym poziomie i wartość IC₅₀ wynosi dla linii MCF7 0,12 μM +/- 0,04 a dla linii MDA-MB-231 0,10 μM +/- 0,08. Co więcej, jak sugerują przedstawione wyniki, bazowy poziom białka ABCB1 w komórkach ma kluczowe znaczenie dla ich wrażliwości na działanie dokсорubicyny. Podobną zależność uzyskał Lovitt i wsp., który wykazał większą wrażliwość komórek linii MDA-MB-231 względem komórek linii MCF7 na działanie dokсорubicyny. Jednakże po 72 godzinach inkubacji wartość IC₅₀ dla komórek linii MCF7 była wyższa i wynosiła 2,25 μM +/- 0,06 a dla komórek MDA-MB-231 0,87 μM +/- 0,01. (213) Możliwe, że różnica w między wynikami przedstawionymi w pracy a niektórymi publikacjami wynika z tego, że analiza białek przeprowadzona została z wykorzystaniem lizatów komórkowych. Białko ABCB1 zostało zidentyfikowane w błonie komórkowej oraz w innych strukturach wewnątrzkomórkowych jak lizosomy (214) mitochondria czy cytoplazma (215). Kopecka i wsp. wskazują na wysoki poziom białka ABCB1 znajdującego się w błonie komórkowej komórek linii MDA-MB-231. (216) Możliwe zatem, że wykorzystanie pełnych lizatów komórkowych może fałszywie zaniżać uzyskane wyniki oceniające poziom białka ABCB1.

W piśmiennictwie, w którym komórki linii MCF7 lub MDA-MB-231 zostały opisane jako ABCB1-ujemne wykazano ich większą wrażliwość na działanie dokсорubicyny. Według Lukyanova i wsp. w komórkach MCF7 nie obserwuje się ekspresji ABCB1 i tym samym wartość IC₅₀ po 48 godzinach inkubacji z dokсорubicyną wynosi 0,5 μg/ml (0,92 μM) (217) natomiast w tej samej linii komórkowej w populacji w której 5,61 +/- 0,52% komórek charakteryzuje się obecnością ABCB1 wartość IC₅₀ jest wyższa i wynosi 0,68 μg/ml +/- 0,04 (1,1 μM) (218). Wynika to najprawdopodobniej z kumulacji dokсорubicyny z komórce, co jest efektem braku mechanizmów skutecznego usuwania leku z jej wnętrza. Komórki MCF7 z bardzo niską pulą ABCB1 kumulują w znacznie większym stopniu dokсорubicenę niż komórki MCF7 z indukowaną ekspresją ABCB1 (MCF7/doxo). (219) Możliwe że efekt kumulacji leków w komórce nie wynika tylko z ilości ABCB1 ale ze zmian w aktywności białka. Wyniki te po raz kolejny w historii badań wskazują na problem homogenności hodowli komórkowych w laboratoriach badawczych na świecie, który może wynikać m.in.

z kontaminacji krzyżowej linii komórkowych lub z niestabilności genetycznej linii komórkowych.

Analiza aktywności białka ABCB1

Obserwowany u niektórych pacjentów wzrost aktywności białka ABCB1 może być efektem wielu czynników. Z jednej strony komórki w wyniku ekspozycji na działanie ksenobiotyków nabywają oporności krzyżowej, która jest związana ze zwiększoną aktywnością białka ABCB1. Z drugiej jednak strony obserwowany efekt może być nie tyle zmianą aktywności białka a zwiększeniem jego ilości będącej efektem zwiększonej ekspresji genu *ABCB1*. (220) Wykazano, że zmiana w ilości białka może wynikać z polimorfizmów genu *ABCB1* 3435C/T lub 2677G/A,T. Jednakże Ocena zależności pomiędzy aktywnością białka a pojedynczym polimorfizmem nie jest łatwa, zwłaszcza w przypadku badań populacyjnych, których wyniki dotyczące polimorfizmu genu *ABCB1* są tak rozbieżne.

W badaniach populacji amerykańskiej pochodzenia europejskiego oraz afroamerykanów wykazano, że obecność formy dzikiej polimorfizmu 2677GG koreluje ze spadkiem aktywności białka czego efektem jest niższe względem homozygot polimorficznych stężenie feksofenadyny w osoczu po doustnym podaniu leku. (130) Z drugiej strony, stężenie cyklosporyny czy takrolimusu w osoczu homozygot dzikich 2677 GG jest wyższe, co może świadczyć o wyższej aktywności białka i usuwaniu leku z komórki. (221,222) W badaniach tych nie uwzględnia się jednak innych czynników wpływających na usuwanie leku z komórki oraz metabolizm leku. W badaniach na leukocytach pobranych od ochotników narodowości niemieckiej będących homozygotami dzikimi 2677GG i 3435CC oraz homozygotami polimorficznymi 2677TT i 3435 TT nie wykazano różnic w szybkości usuwania rodaminę 123 z komórek. (223) Natomiast w populacji kaukaskiej wykazano zależną od polimorfizmu genu *ABCB1* ilość rodaminę 123 w leukocytach. Stężenie fluorochromu w leukocytach homozygot dzikich 3435CC jest mniejsze względem homozygot polimorficznych 3435TT a heterozygoty charakteryzują się pośrednim stężeniem rodaminę 123. (224) Jednakże stężenie przeciwwirusowego nelfinawiru wykorzystywanego w leczeniu zakażeń wirusem HIV w komórkach linii LCL (ang. *lymphoblastoid cell lines*) (225) czy przeciwhistaminowej feksofenadyny w osoczu (130) było wyższe w homozygotach polimorficznych 3435TT niż dzikich 3435CC, co wskazuje na niższą aktywność ABCB1 związaną z polimorfizmem.

W związku z rozbieżnością wyników badań postanowiono ocenić genotyp komórek dwóch linii raka piersi oraz spróbować ocenić zależność pomiędzy polimorfizmem a aktywnością białka ABCB1. Komórki linii MDA-MB-231, które charakteryzują się niskim

poziomem białka ABCB1 scharakteryzowano pod kątem m.in. polimorfizmów genu *ABCB1* i oceniono je jako homozygoty polimorficzne 3435TT oraz oraz heterozygoty 2677GT. Komórki linii MCF7 natomiast charakeryzują się znacznie wyższym poziomem białka ABCB1 i opisane zostały jako homozygoty dzięki zarówno pod względem polimorfizmu 3435CC jak i 2677GG. W obydwu liniach oceniono z wykorzystaniem rodaminy 123 jako substratu dla białka ABCB1 aktywność białka i wykazano, że znacznie niższą fluorescencję komórek linii MCF7 oraz szybszy zanik fluorescencji niż w komórkach MDA-MB-231. Komórki linii MCF7 maksimum fluorescencji osiągnęły już po godzinie inkubacji z fluorochromem i w kolejnym czasie nastąpił zanik sygnału. Natomiast w komórkach MDA-MB-231 maksymalną fluorescencję obserwuje się po 1,5 godzinie od dodania rodaminy 123 i jest ona znacznie wyższa niż w komórkach MCF7 (46,5 \pm 1 vs. 31,5 \pm 1). Wykazano także istotną statystycznie większą kumulację związku w komórkach linii MDA-MB-231 niż w komórkach MCF7 po 1,5 godzinnej inkubacji z rodaminą 123. W związku z tym sugeruje się że komórki linii MCF7 mają wyższy, względem komórek linii MDA-MB-231, poziom białka ABCB1. Możliwe jest także że komórki tej linii posiadają białko ABCB1 o wyższej aktywności. Możliwe, że efekt ten wynikać może z polimorfizmów genu *ABCB1*. Komórki linii MCF7 opisano jako homozygoty dzięki zarówno pod względem polimorfizmu 3435CC jak i 2677GG. Jednakże zależność ta nie jest jednoznaczna dlatego też wymaga szczegółowych badaniach uwzględniających zarówno ocenę wpływu różnych genotypów tej samej linii na aktywność białka ABCB1 czy oceny mechanizmu regulacji aktywności/ilości białka wynikającej z poszczególnych genotypów.

6. Wnioski

1. Otyłość jest istotnym czynnikiem ryzyka zachorowania na raka piersi kobiet w wieku menopauzalnym z województwa wielkopolskiego a fakt ten koreluje pozytywnie z danymi pochodzącymi z innych populacji
2. Występowanie polimorfizmów genów *LEP*, *LEPR* i *ABCB1* nie wpływa istotnie na ryzyko zachorowania na raka piersi oraz stopień zaawansowania choroby nowotworowej u kobiet w wieku menopauzalnym z województwa wielkopolskiego
3. Występowanie polimorfizmów genów *LEP* (2548G/A) oraz *LEPR* (223 Gln/Arg) koreluje z ekspresją receptora progesteronowego PgR i receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu w komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego, co może stanowić istotny czynnik prognostyczny
4. Występowanie polimorfizmów genu *ABCB1* w pozycjach 3435 (C/T) oraz 2677 (G/A,T) może korelować ze wzrostem ekspresji genu *ABCB1* i w konsekwencji ze wzrostem poziomu i aktywności białka ABCB1 w komórkach raka piersi

7. Streszczenie

W skali świata, nowotwór piersi uznawany jest za najbardziej rozpowszechniony typ nowotworu wśród kobiet. Aż 34% kobiet żyjących z nowotworem choruje właśnie na raka piersi. W Polsce w 2013 roku zdiagnozowano 17142 nowych przypadków zachorowania na raka piersi i było ich o ponad 6000 więcej niż w 1999 roku. Ponadto, często ze względu na późną diagnozę, nowotwór piersi jest najczęstszą przyczyną zgonu kobiet. W związku z tym poszukuje się nowych markerów diagnostycznych umożliwiających szybszą diagnostykę. Poszukuje się także molekularnych markerów mogących mieć wpływ zarówno na funkcjonowanie pojedynczej komórki jak i całego organizmu co w efekcie może doprowadzić do rozwoju choroby nowotworowej lub zmniejszyć efektywność chemioterapii.

W związku z tym celem niniejszej pracy była ocena przydatności identyfikacji polimorfizmów genów *ABCB1*, *LEP* i *LEPR* jako potencjalnych markerów diagnostycznych i predykcyjnych w raku piersi u kobiet z województwa wielkopolskiego. W tym celu określono genotyp poszczególnych polimorfizmów u kobiet zdrowych, które stanowiły kontrolę oraz kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi. Badaniami objęto 209 kobiet w wieku 59,6±11 lat u których zdiagnozowano raka piersi oraz 202 zdrowych kobiet w wieku 57,8±8,2 lata, które były dawczyniami krwi Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu. U kobiet, które zostały zakwalifikowane do badań oznaczono genotyp pod względem polimorfizmów genów *ABCB1* (3435C/T; 2677G/A,T), *LEP* (2548G/A) oraz *LEPR* (223Gln/Arg; 109Lys/Arg). Uzyskane wyniki skorelowano z masą ciała kobiet zdrowych i kobiet chorujących na raka piersi oraz częstością występowania poszczególnych alleli w badanych grupach co umożliwiło ocenę udziału tych polimorfizmów w zachorowaniu na raka piersi. Oceniono także zależność pomiędzy badanymi polimorfizmami a ekspresją, na powierzchni komórek raka piersi, receptorów estrogenowych, progesteronowych i naskórkowego czynnika wzrostu. Ponadto określono udział badanych polimorfizmów w zaawansowaniu raka piersi wyrażonym wielkością guza pierwotnego, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych oraz stopniem histologicznego zróżnicowania nowotworu. Postanowiono także ocenić w warunkach *in vitro* zależność pomiędzy polimorfizmami genu *ABCB1* a poziomem i aktywnością białka ABCB1 i w konsekwencji odpowiedzią komórek raka piersi linii MCF7 i MDA-MB-231 na działanie doksorubicyna - substratu ABCB1.

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że otyłość jest istotnym czynnikiem ryzyka zachorowania na raka piersi kobiet z województwa wielkopolskiego. Jednakże nie wykazano udziału badanych polimorfizmów w zwiększaniu ryzyka

zachorowania na raka piersi oraz ich wpływu na stopień zaawansowania choroby nowotworowej. Możliwe jest, że polimorfizmy *LEP* (2548G/A) oraz *LEPR* (223 Gln/Arg) mogą pozytywnie korelować z ekspresją receptorów progesteronowych oraz naskórkowego czynnika wzrostu na powierzchni komórek raka piersi. Jednakże zależność ta wymaga pogłębionej analizy z uwzględnieniem większej liczby pacjentów.

W kolejnym etapie badań podjęto próbę oceny udziału polimorfizmów *ABCB1* w regulacji ekspresji genu i w konsekwencji poziomu białka ABCB1. Postanowiono także ocenić udział tych polimorfizmów w regulacji aktywności białka. Co ciekawe, wykazano, że choć do badań wykorzystano modelowe linie raka piersi, zdefiniowane i dobrze opisane, okazało się, że różnią się one genotypem względem danych literaturowych. Linie komórkowe poddane analizie w ramach realizacji niniejszej pracy oceniono jako podwójną homozygotę dziką 3435CC, 2677GG (MCF7) oraz homozygotę polimorficzną 3435TT i heterozygotę 2677G/T (MDA-MB-231), co w efekcie może wpływać na poziom oraz aktywność białka ABCB1. Homozygotyczne komórki linii MCF7 charakteryzują się znacznie większym, względem MDA-MB-231, poziomem oraz aktywnością białka ABCB1. Postuluje się zatem, że obecność takiego genotypu może z jednej strony zabezpieczać organizm przed kumulacją szkodliwych ksenobiotyków i zmniejszać ryzyko zachorowania na raka piersi a z drugiej strony zmniejszać efektywność terapii przeciwnowotworowej. Założenie to potwierdzają wyniki uzyskane w trakcie realizacji niniejszej pracy. Wykazano zależność pomiędzy polimorfizmem genu *ABCB1*, poziomem białka ABCB1 i jego wysoką aktywnością, a mniejszą wrażliwością komórek linii MCF7 na działanie doksorubicyny. Wyniki te mogą posłużyć jako wstęp do pogłębionej analizy *in vitro* oraz oceny udziału polimorfizmów w biodystrybucji ksenobiotyków w organizmie ludzki oraz w odpowiedzi na terapię przeciwnowotworową.

8. Abstract

Identification of breast cancer markers based on the analysis of polymorphisms in the genes *ABCB1*, *LEP* and *LEPR* and the assessment of the role of P-glycoprotein in the response of breast cancer cell lines to doxorubicin

On a global scale, breast cancer is considered the most common type of cancer among women. As many as 34% of women living with cancer have breast cancer. In Poland, in 2013, 17,142 new cases of breast cancer were diagnosed, and there were over 6,000 cases more than in 1999. In addition, often due to late diagnosis, breast cancer is the most common cause of death in females. Therefore, new diagnostic markers are being sought that enable faster diagnostics of cancer. Molecular markers are also being sought that can affect both the functioning of a single cell and the whole organism, which in turn may lead to the development of cancer or reduce the effectiveness of chemotherapy.

Therefore, the aim of this study was to assess the usefulness of identifying *ABCB1*, *LEP*, and *LEPR* gene polymorphisms as potential diagnostic and predictive markers in breast cancer in women from Greater Poland region. For this purpose, the genotype of individual polymorphisms was determined in healthy women who were in the control group and women diagnosed with breast cancer. The study involved 209 women aged 59.6 +/- 11 years who were diagnosed with breast cancer and 202 healthy women aged 57.8 +/- 8.2 years, who were blood donors of the Center for Blood Donation and Blood Treatment in Poznań. The genotype for the polymorphisms of the genes *ABCB1* (3435C / T, 2677G / A, T), *LEP* (2548G / A) and *LEPR* (223Gln / Arg; 109Lys / Arg) was determined in women who were qualified for the study. The obtained results were correlated with the body weight of healthy women and women suffering from breast cancer and the frequency of individual alleles in the studied groups, which enabled the assessment of the participation of these polymorphisms in the development of breast cancer. The relationship between the studied polymorphisms, and the expression on the surface of breast cancer cells, estrogen receptors, progesterone, and epidermal growth factor receptors was also evaluated. In addition, the association of investigated polymorphisms with breast cancer progression expressed by the size of the primary tumor, the presence of lymph node metastases and tumor grading was determined. It was also decided to evaluate *in vitro* the relationship between *ABCB1* gene polymorphisms and the level and activity of ABCB1 protein and consequently the response of MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells to treatment with doxorubicin – the substrate of ABCB1.

Results of the conducted study revealed that obesity is an important risk factor for breast cancer in women from the Greater Poland region. However, the participation of studied polymorphisms in increasing the risk of breast cancer and their effect on the severity of neoplastic disease has not been demonstrated. It is possible that polymorphisms *LEP* (2548G / A) and *LEPR* (223 Gln / Arg) may positively correlate with the expression of progesterone receptors and epidermal growth factor receptors on the surface of breast cancer cells. However, this dependence requires in-depth analysis taking into account more patients.

In the next stage of the research, an attempt was made to assess the share of *ABCB1* polymorphisms in the regulation of gene expression and, consequently, the level of *ABCB1* protein. It was also decided to assess the role of these polymorphisms in the regulation of protein activity. Interestingly, it was shown that although well described and defined model breast cancer lines were used, it turned out that they differed in genotypes from literature data. The cell lines analyzed as part of the present study were evaluated as a dual wild-type 3435CC, 2677GG (MCF7) homozygote and 3435TT polymorphic homozygote and 2677G / T heterozygote (MDA-MB-231), which may affect the level and activity of the *ABCB1* protein. Homozygous cells of the MCF7 line are characterized by a much higher, relative to MDA-MB-231, level and activity of the *ABCB1* protein. It is postulated, therefore, that the presence of such a genotype may, on the one hand, protect the body from the accumulation of harmful xenobiotics and reduce the risk of breast cancer and, on the other hand, reduce the effectiveness of anti-cancer therapy. This assumption is confirmed by the results obtained during the implementation of this work. The relationship between the *ABCB1* gene polymorphism, *ABCB1* protein level, and its high activity was demonstrated, and the sensitivity of MCF7 cells to doxorubicin occurred to be lower. These results can be used as a preliminary to in-depth *in vitro* analysis and assessment of polymorphism participation in the biodistribution of xenobiotics in the human body and response to anti-cancer therapy

9. Piśmiennictwo

1. Skokowski J, Jankau J, Renkielska A, Jaśkiewicz J. 5000 Lat Krzywej Uczenia Się Chirurgii Raka Piersi Surgery. 2011;5(2):123–9.
2. Kajowy rejestr nowotworów [Internet]. [cytowane 29 marzec 2019]. Dostępne na: <http://onkologia.org.pl/>
3. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk - Where do we stand in 2005? J Cell Mol Med. 2005;9(1):208–21.
4. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2016;25(1):16–27.
5. Global Cancer Observatory [Internet]. Dostępne na: <http://gco.iarc.fr/>
6. Smaga A, Mikułowska M. Rak piersi w Polsce. Sequence. 2014;3–66.
7. Fentiman IS, Fourquet A, Hortobagyi GN. Seminar Male breast cancer. thelancet.com. 2006;367:595.
8. Tuchowska P, Worach-Kardas H, Marcinkowski JT. Najczęstsze nowotwory złośliwe w Polsce-główne czynniki ryzyka i możliwości optymalizacji działań profilaktycznych The most frequent malignant tumors in Poland-the main risk factors and opportunities to optimize preventive measures. Probl Hig Epidemiol. 2013;94(2):166–71.
9. Madrela-Kuder E. czynniki ryzyka raka piersi – Porównanie wiedzy na ten temat u „Amazonki” i kobiet zdrowych w wieku 40 – 60 lat. 2014;2(47).
10. Comprehensive Cancer Information - National Cancer Institute [Internet]. Dostępne na: <https://www.cancer.gov/>
11. Olbryt M, Rusin A, Fokt I, Habryka A, Tudrej P, Student S, i in. Bis-anthracycline WP760 abrogates melanoma cell growth by transcription inhibition, p53 activation and IGF1R downregulation. Invest New Drugs. 2017;35(5):545–55.
12. Research WCRFAI of C, 2018. WCRFI for CRCUPER. Diet , nutrition , physical activity and breast cancer. Contin Updat Proj. 2018;
13. Zeidler R, Albermann K, Lang S. Nicotine and apoptosis. Apoptosis. 28 wrzesień 2007;12(11):1927–43.
14. Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Ryan Diver W, Hannan LM, Thun MJ. Active smoking and breast cancer risk: Original cohort data and meta-analysis. J Natl Cancer Inst. 2013;105(8):515–25.
15. Xue F, Willett WC, Rosner BA, Hankinson SE, Michels KB. Cigarette smoking and the incidence of breast cancer. Arch Intern Med. 2011;171(2):125–33.
16. Luo J, Horn K, Ockene JK, Simon MS, Stefanick ML, Tong E, i in. Interaction between smoking and obesity and the risk of developing breast cancer among postmenopausal women: The Women’s Health Initiative Observational Study. Cancer Res. 2012;71(8):946–946.
17. Petros WP, Younis IR, Ford JN, Weed SA. Effects of tobacco smoking and nicotine on cancer treatment. Pharmacotherapy. 2012;32(10):1–17.
18. Ronckers CM, Erdmann CA, Land CE. Radiation and breast cancer: A review of current evidence. Breast Cancer Res. 2005;7(1):21–32.

19. Wu G, Wu J, Wan Y, Liu W, Li W, Zong W, i in. Turnover of BRCA1 Involves in Radiation-Induced Apoptosis. *PLoS One*. 2010;5(12):1–11.
20. Henderson BR. The BRCA1 Breast Cancer Suppressor: Regulation of Transport, Dynamics, and Function at Multiple Subcellular Locations. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:1–15.
21. Zhang ZZ, Liu YJC, Yin XL, Zhan P, Gu Y, Ni XZ. Loss of BRCA1 expression leads to worse survival in patients with gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2013;29(12):1968–74.
22. Galizia F, Giorgetti G, Piccinini G, Santineli A, Loretelli C, Bianchi F, i in. BRCA1 expression in triple negative sporadic breast cancers. *Anal Quant Cytol Histol*. 2010;32(1):24–9.
23. He C, Taj Anand S, Ebell MH, Vena JE, Wagner Robb S. Circadian disrupting exposures and breast cancer risk: a meta analysis. *Int Arch Occup Env Heal*. 2015;88(5):533–47.
24. Hansen J. Breast Cancer Among Women Who Work at Night. *Epidemiology*. 2003;12(1):74–7.
25. Lumachi F, Maruzzo M, Brunello A, Basso S, Basso U. Treatment of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Curr Med Chem*. 2013;20(5):596–604.
26. Tryggvadóttir L, Tulinius H, Eyfjord JE, Sigurvinsson T. Breast cancer risk factors and age at diagnosis: An Icelandic cohort study. *Int J Cancer*. 2002;98:604–8.
27. Franca EL, Honorio-Franca AC, Ferreira MC, Franca-Botelho ADC, Franca JL. Breastfeeding and its Relationship with Reduction of Breast Cancer: A Review. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2013;13(11):5327–32.
28. Gronwald J, Byrski T, Huzarski T, Oszurek O, Szymańska A, Szymańska-Pasternak J, i in. Dziedziczny rak piersi i jajnika. *Postępy Nauk Med*. 2008;7:446–55.
29. Jaworski P, Binada A, Tarnowski W. Wpływ otyłości na rozwój choroby nowotworowej. *Postępy Hig Med Dosw*. 2015;28(9):673–6.
30. Grodecka-Gazdecka S. Związki otyłości z rakiem piersi. *Wybrane Probl Klin*. 2011;2(4):231–8.
31. Gonzalez-Perez RR, Lanier V, Newman G. Leptin's pro-angiogenic signature in breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2013;5:1140–62.
32. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *Cancer J Clin*. 2017;67(5):378–97.
33. Surmacz E. Obesity hormone leptin: A new target in breast cancer? *Breast Cancer Res*. 2007;9(301):1–2.
34. Ligibel JA, Goodwin PJ, Alfano CM, Hershman D, Ballard RM, Bruinooge SS, i in. Recommendations for obesity clinical trials in cancer survivors: American Society of Clinical Oncology statement. *J Clin Oncol*. 2015;63:1440.
35. Rose DP, Gracheck PJ, Davis LV. The interactions of obesity, inflammation and insulin resistance in breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2015;7:2147–68.
36. Wielogórka J, Kręgielska-Narożna M, Bogdański P. Modyfikacja stylu życia jako element prewencji raka piersi otyłej pacjentki. *Wybrane Probl Klin*. 2016;7(4):162–9.

37. Hardefeldt P, Eslick G, Edirimanne S. Benign thyroid disease is associated with breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133(3):1169–77.
38. Kuzior K, Gorczyca W. Odruch zapalny jako przykład współzależności między układem odpornościowym i nerwowym. 2010;139–51.
39. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: Clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4–5):391–7.
40. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860–7.
41. Kozłowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P, Wojtukiewicz MZ. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Białymst.* 2003;48:82–4.
42. Chen YK, Lin CL, Cheng FTF, Sung FC, Kao CH. Cancer risk in patients with Hashimoto's thyroiditis: A nationwide cohort study. *Br J Cancer.* 2013;109:2496–501.
43. Hilakivi-Clarke L. Maternal exposure to diethylstilbestrol during pregnancy and increased breast cancer risk in daughters. *Breast Cancer Res.* 2014;16(2):208.
44. Biggar RJ, Wohlfahrt J, Oudin A, Hjulter T, Melbye M. Digoxin use and the risk of breast cancer in women. *J Clin Oncol.* 2011;29(16):2165–70.
45. Ahern TP, Tamimi RM, Rosner BA, Hankinson SE. Digoxin use and risk of invasive breast cancer: Evidence from the Nurses' Health Study and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;144(2):427–35.
46. Pettersson A, Graff RE, Ursin G, Dos Santos Silva I, McCormack V, Baglietto L, i in. Mammographic density phenotypes and risk of breast cancer: A meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(5):1–11.
47. Zhou W Bin, Xue DQ, Liu XA, Ding Q, Wang S. The influence of family history and histological stratification on breast cancer risk in women with benign breast disease: A meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137:1053–60.
48. Soerjomantaram I, Louwman W, Lemmens V, de Vries E, Klokman W, Coebergh J. Risk of second primary breast and urogenital cancer following female breast cancer in the south of the Netherlands, 1972-2001. *Eur J Cancer.* 2005;41(15):2331–7.
49. Rubino C, Arriagada R, Delalogue S, Lê MG. Relation of risk of contralateral breast cancer to the interval since the first primary tumour. *Br J Cancer.* 2010;102:213–9.
50. Kim B-K, Choi Y-H, Song Y-M, Park J-H, Noh H-M, Nguyen TL, i in. Bone mineral density and the risk of breast cancer: a case-control study of Korean women. *Ann Epidemiol.* marzec 2014;24(3):222–7.
51. Clark SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GD V, Boehning D. Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J.* 1 kwiecień 2012;1(1):1–8.
52. Metcalfe K, Gershman S, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, Kim-Sing C, i in. Predictors of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer.* 12 kwiecień 2011;104(9):1384–92.
53. McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci U S A.* styczeń 1986;83(1):130–4.

54. Tanaka T, Watanabe M, Yamashita K. Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer. *Oncotarget*. 23 marzec 2018;9(22):16234–47.
55. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, i in. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 30 listopad 1990;250(4985):1233–8.
56. Leslie NR, Downes CP. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J*. 2004;382(1):1.
57. Choi J, Cha YJ, Koo JS. Adipocyte biology in breast cancer: From silent bystander to active facilitator. *Prog Lipid Res*. 2018;69(August 2017):11–20.
58. Apostolou ioannis Papisotiriou P. Breast Cancer-Targets and Therapy Dovepress Current perspectives on CHEK2 mutations in breast cancer. *Breast Cancer Targets Ther*. 2017;9:331–5.
59. Cybulski C, Wokołarczyk D, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, i in. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(28):3747–52.
60. Schillaci R, Guzmán P, Cayrol F, Beguelin W, Flaqué MCD, Proietti CJ, i in. Clinical relevance of ErbB-2/HER2 nuclear expression in breast cancer. *BMC Cancer*. 22 luty 2012;12(74):1–12.
61. Dębska S, Potemski P. Leczenie hormonalne chorych na raka piersi z nadekspresją receptora HER2. *Onkol w Prakt Klin*. 2010;6(6):301–10.
62. Kunc M, Biernat W, Senkus-Konefka E. Estrogen receptor-negative progesterone receptor-positive breast cancer - Nobodys land or just an artifact. *Cancer Treat Rev*. 1 czerwiec 2018;67:78–87.
63. Ragab HM, Samy N, Afify M, El Maksoud NA, Shaaban HAM. Assessment of Ki-67 as a potential biomarker in patients with breast cancer. *J Genet Eng Biotechnol*. 2018;16(2):479–84.
64. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Predic Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Mol Med Rep*. 2015;11(3):1566–72.
65. Cammisotto P, Bendayan M. A review on gastric leptin: the exocrine secretion of a gastric hormone. *Anat Cell Biol*. 2012;45:1–16.
66. Denroche HC, Huynh FK, Kieffer TJ. The role of leptin in glucose homeostasis. *J Diabetes Investig*. 28 marzec 2012;3(2):115–29.
67. Brannian JD, Hansen KA. Leptin and Ovarian Folliculogenesis: Implications for Ovulation Induction and ART Outcomes. *Semin Reprod Med*. 2002;20(2):103–12.
68. Ramos CF, Zamoner A. Thyroid hormone and leptin in the testis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5(198):1–12.
69. Candelaria P V, Rampoldi A, Harbuzariu A, Gonzalez-Perez RR. Leptin signaling and cancer chemoresistance: Perspectives. *World J Clin Oncol*. 2017;8(2):106.
70. Lee K-M, Noh D-Y, Yom CK, Jeong K-Y, Han W, Kim HS, i in. Leptin as a Potential Target for Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2013;16(2):138.
71. Cha Y, Kang Y, Moon A. HER2 induces expression of leptin in human breast epithelial cells. *BMB Rep*. grudzień 2012;45(12):719–23.

72. Gyamfi J, Eom M, Koo JS, Choi J. Multifaceted Roles of Interleukin-6 in Adipocyte–Breast Cancer Cell Interaction. *Transl Oncol.* 2018;11(2):275–85.
73. Zheng Q, Banaszak L, Fracci S, Basali D, Dunlap SM, Hursting SD, i in. Leptin receptor maintains cancer stem-like properties in triple negative breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* grudzień 2013;20(6):797–808.
74. Dutta D, Ghosh S, Chowdhury S, Pandit K, Mukhopadhyay P. Leptin and cancer: Pathogenesis and modulation. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013;16(9):596.
75. Friedman JM, Leibel RL, Siegel DS, Walsh J, Bahary N. Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics.* 1 grudzień 1991;11(4):1054–62.
76. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* grudzień 1994;372(6505):425–32.
77. Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, Okazaki T, i in. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem.* 17 listopad 1995;270(46):27728–33.
78. Gong DW, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem.* 1996;271(8):3971–4.
79. Bailleul B, Akerblom I, Strosberg AD. The leptin receptor promoter controls expression of a second distinct protein. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(14):2752–8.
80. Zabeau L, Tavernier J, Moharana K, Peelman F, Savvides SN. 20 years of leptin: Insights into signaling assemblies of the leptin receptor. *J Endocrinol.* 2014;223(1):T9–23.
81. Wauman J, Zabeau L, Tavernier J. The leptin receptor complex: Heavier than expected? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8(30):1–20.
82. Harvey J, Solovyova N, Irving A. Leptin and its role in hippocampal synaptic plasticity. *Prog Lipid Res.* 2006;45(5):369–78.
83. Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism.* styczeń 2015;64(1):13–23.
84. Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin—the classical, resistin—the controversial, adiponectin—the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005;19(4):525–46.
85. Jackson MB, Ahima RS. Neuroendocrine and metabolic effects of adipocyte-derived hormones. *Clin Sci.* 2006;110(2):143–52.
86. Genecards [Internet]. Dostępne na: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LEPR>
87. Gene: Lepr (ENSMUSG00000057722) [Internet]. Dostępne na: http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000057722;r=4:101717404-101815352
88. Yang Y, Niu T. A meta-analysis of associations of LEPR Q223R and K109R polymorphisms with Type 2 diabetes risk. *PLoS One.* 2018;13(1):1–25.
89. Gaukrodger N, Mayosi BM, Imrie H, Avery P, Baker M, Connell JMC, i in. A rare variant of the leptin gene has large effects on blood pressure and carotid intima-medial thickness: a study of 1428 individuals in 248 families. *J Med Genet.* 2005;42(6):474–8.

90. Sahin DS, Tumer C, Demir C, Celik MM, Celik M, Ucar E, i in. Association with Leptin Gene c.-2548 G>A Polymorphism, Serum Leptin Levels, and Body Mass Index in Turkish Obese Patients. *Cell Biochem Biophys*. 2013;65:243–7.
91. Chavarria-Avila E, Vázquez-Del Mercado M, Gomez-Bañuelos E, Ruiz-Quezada SL, Castro-Albarran J, Sánchez-López L, i in. The impact of LEP G-2548A and LEPR Gln223Arg polymorphisms on adiposity, leptin, and leptin-receptor serum levels in a Mexican Mestizo population. *Biomed Res Int*. 2015;1–10.
92. Ma González Huerta L, Santos Cabrera CI, Mociños Montes R, Cuellar HU, Toral López J, Cuevas Covarrubias SA. Association between leptin and leptin receptor gene polymorphisms and breast cancer risk in premenopausal and postmenopausal Mexican women. *Cancer Res Front*. 2017;3(1):56–63.
93. Hinuy HM, Hirata MH, Forti N, Diament J, Sampaio MF, Armaganijan D, i in. Leptin G-2548A Promoter Polymorphism is Associated with Increased Plasma Leptin and BMI in Brazilian Women. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52(4):611–6.
94. Banihani SA, Elmadhoun RA, Khabour OF, Alzoubi KH. The rs2167270 polymorphism of leptin gene is associated with atopic dermatitis. *Dermatoendocrinol*. 2018;10(1):1–5.
95. Knuła H, Rubiś B, Rybczyńska M. The roles of leptin and LEP and LEPR gene polymorphisms in pathogenesis of breast cancer. *Wspolczesna Onkol*. 2009;13(6):287–91.
96. Ferreira-Julio MA, Pinhel MS, Quinhoneiro DCG, Nicoletti CF, Brandão AC, Nonino CB, i in. LEP-2548G>A polymorphism of the leptin gene and its influence on the lipid profile in obese individuals. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2014;7:225–31.
97. Ben Ali S, Kallel A, Ftouhi B, Sediri Y, Feki M, Slimane H, i in. Association of G-2548A LEP polymorphism with plasma leptin levels in Tunisian obese patients. *Clin Biochem*. 2009;42(7–8):584–8.
98. Dr. C.Anuradha, P.Madan Ranjit , D.Surekha , D.Raghunadharao, N.Santhoshi Rani SV. Association of Leptin receptor (LEPR) Q223R Polymorphism with breast cancer. *Glob J Med Res*. 10 luty 2012;12(1):20–30.
99. Lu J, Zou D, Zheng L, Chen G, Lu J, Feng Z. Synergistic effect of LEP and LEPR gene polymorphism on body mass index in a Chinese population. *Obes Res Clin Pract*. 2013;7:445–9.
100. Brandl EJ, Frydrychowicz C, Tiwari AK, Lett TAP, Kitzrow W, Büttner S, i in. Association study of polymorphisms in leptin and leptin receptor genes with antipsychotic-induced body weight gain. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2012;38(2):134–41.
101. Hastuti P, Zukhrufia I, Padwaswari MH, Nuraini A, Sadewa AH. Polymorphism in leptin receptor gene was associated with obesity in Yogyakarta, Indonesia. *Egypt J Med Hum Genet*. 2016;17:271–6.
102. Ursal M, Nurten K, Karakus N, Tural S, Elbistan M. Effects of leptin and leptin receptor gene polymorphism on lung cancer. *Tumor Biol*. 2014;35(10):10231–6.
103. Anuradha C, Madanranjit P, Surekha D, Raghunadharao D, Santhoshi Rani V, Vishnupriya S. Associaton of leptin receptor (LEPR) Q223R polymorphism with breast cancer. *Glob J Med Res*. 2012;12(1):20–31.

104. Ling W, Yu H, Yuan H, Yao B. Original Article LEPR polymorphisms and smoking interactions associated with the risk of gastric cancer. 2016;9(2):2229–34.
105. Mahmoudi R, Noori Alavicheh B, Nazer Mozaffari MA, Fararouei M, Nikseresht M. Polymorphisms of Leptin (-2548 G/A) and Leptin Receptor (Q223R) Genes in Iranian Women with Breast Cancer. *Int J Genomics*. 2015;1–6.
106. Snoussi K, Strosberg AD, Bouaouina N, Ahmed S Ben, Helal AN, Chouchane L. Leptin and leptin receptor polymorphisms are associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2006;6(38):1–10.
107. Okobia MN, Bunker CH, Garte SJ, Zmuda JM, Ezeome ER, Anyanwu SN, i in. Leptin receptor Gln223Arg polymorphism and breast cancer risk in Nigerian women: A case control study. *BMC Cancer*. 2008;18(8):1–8.
108. Liu C-R, Li Q, Hou C, Li H, Shuai P, Zhao M, i in. Changes in Body Mass Index, Leptin, and Leptin Receptor Polymorphisms and Breast Cancer Risk. *DNA Cell Biol*. 1 marzec 2018;37(3):182–8.
109. Mohammadzadeh G, Ghaffari MA, Bafandeh A, Hosseini SM, Ahmadi B. The relationship between -2548 G/A leptin gene polymorphism and risk of breast cancer and serum leptin levels in Ahvazian women. *Iran J Cancer Prev*. 2015;2:100–8.
110. Méndez-Hernández A, Gallegos-Arreola MP, Moreno-Macías H, Espinosa Fematt J, Pérez-Morales R. LEP rs7799039, LEPR rs1137101, and ADIPOQ rs2241766 and 1501299 Polymorphisms Are Associated With Obesity and Chemotherapy Response in Mexican Women With Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2017;17(6):453–62.
111. Wilkens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*. 2015;7(17):1–9.
112. Hunt JF, Wang C, Ford RC. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (ABCC7) Structure. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;1989:1–29.
113. Tulsyan S, Mittal RD, Mittal B. The effect of ABCB1 polymorphisms on the outcome of breast cancer treatment. *Pharmgenomics Pers Med*. 2016;9:47–58.
114. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, i in. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science (80-)*. 2009;323(5922):1718–22.
115. Fortuna A, Alves G, Falcão A. In vitro and In vivo Relevance of the P-glycoprotein Probe Substrates in Drug Discovery and Development: Focus on Rhodamine 123, Digoxin and Talinolol. *J Bioequiv Availab*. 2011;01(02):2–24.
116. Hano M, Tomášová L, Šereš M, Pavlíková L, Breier A, Sulová Z. Interplay between P-glycoprotein expression and resistance to endoplasmic reticulum stressors. *Molecules*. 2018;23(2):1–21.
117. Ieiri I. Functional Significance of Genetic Polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metab Pharmacokinet*. 2011;27(1):85–105.
118. P-glycoprotein/ABCB1 Substrates - DrugBank [Internet]. Dostępne na: <https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT002668>
119. ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (ABCB1) [Internet]. Dostępne na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?UGID=704192&TAXID=9606&SEARCH=abcb1>

120. Brambila-Tapia AJL. MDR1 (ABCB1) polymorphisms: Functional effects and clinical implications. *Rev Investig Clin.* 2013;65(5):445–54.
121. Fung KL. A synonymus polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1794(5):860–71.
122. Mrozikiewicz PM, Seremak-Mrozikiewicz A, Semczuk A, Landt O, Breborowicz GH, Drews K. The significance of C3435T point mutation of the MDR1 gene in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17(3):728–31.
123. Wasilewska A, Zalewski G, Chyczewski L, Zoch-Zwierz W. MDR-1 gene polymorphisms and clinical course of steroid-responsive nephrotic syndrome in children. *Pediatr Nephrol.* 2007;22(1):44–51.
124. Rubiś B, Hołysz H, Barczak W, Gryczka R, Łaciński M, Jagielski P, i in. Study of ABCB1 polymorphism frequency in breast cancer patients from Poland. *Pharmacol Reports.* 2012;64(6):1560–6.
125. Gałęcki P, Mirowski M, Talarowska M, Sałagacka A, Jeleń AM, Żebrowska MK, i in. The Influence of C3435T Polymorphism of the ABCB1 Gene on Genetic Susceptibility to Depression and Treatment Response in Polish Population - Preliminary Report . *Int J Med Sci.* 2015;12(12):974–9.
126. Cizmarikova M, Wagnerova M, Schonova L, Habalova V, Kohut A, Linkova A, i in. MDR1 (C3435T) polymorphism: Relation to the risk of breast cancer and therapeutic outcome. *Pharmacogenomics J.* 2010;10:62–9.
127. Chung HC, Roh JK, Im C-K, Chang H, Rha SY, Yoo NC, i in. Association of the ABCB1 gene polymorphisms 2677G>T/A and 3435C>T with clinical outcomes of paclitaxel monotherapy in metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2008;20(2):272–7.
128. Turgut S, Yaren A, Kursunluoglu R, Turgut G. MDR1 C3435T Polymorphism in Patients with Breast Cancer. *Arch Med Res.* 2007;38(5):539–44.
129. Sakurai A, Onishi Y, Hirano H, Seigneuret M, Obanayama K, Kim G, i in. Quantitative Structure–Activity Relationship Analysis and Molecular Dynamics Simulation To Functionally Validate Nonsynonymous Polymorphisms of Human ABC Transporter ABCB1 (P-Glycoprotein/MDR1). *Biochemistry.* lipiec 2007;46(26):7678–93.
130. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba S V., Schwarz UI, i in. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70(2):189–99.
131. Potocnik U, Ravnik-Glavac M, Golouh R, Glavac D. Naturally occurring mutations and functional polymorphisms in multidrug resistance 1 gene: correlation with microsatellite instability and lymphoid infiltration in colorectal cancers. *J Med Genet.* 2002;39(5):340–6.
132. Borecki K, Zawada I, Pawinska-Matecka A, Salkic NN, Karakiewicz B, Adler G. ABCB1 3435C> T and 2677G> T/A polymorphisms in Polish and Bosnian Crohn's disease patients—A preliminary report. *Bosn J Basic Med Sci.* 2017;323–7.

133. Burnier M, Bergmann S, Waterworth DM, Bochud M, Mooser V, Vollenweider P, i in. Association of ABCB1 genetic variants with renal function in Africans and in Caucasians. *BMC Med Genomics*. 2008;1(21).
134. Vaclavikova R, Nordgard S, Alnaes G, Hubackova M, Hlavata I, Kodet R, i in. The role of ABCB1 transporter gene in breast cancer resistance. *W: Cancer Research*. 2009. s. 4158.
135. Macías-Gómez NM, Gutiérrez-Angulo M, Leal-Ugarte E, Ramírez-Reyes L, Peregrina-Sandoval J, Meza-Espinoza JP, i in. MDR1 C3435T polymorphism in Mexican patients with breast cancer. *Genet Mol Res*. 2014;13(3):5018–24.
136. Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, i in. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol*. 2003;22(5):1117–21.
137. Lévy P, Gligorov J, Antoine M, Rezai K, Lévy E, Selle F, i in. Influence of ABCB1 polymorphisms and docetaxel pharmacokinetics on pathological response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. czerwiec 2013;139(2):421–8.
138. Wu H, Kang H, Liu Y, Tong W, Liu D, Yang X, i in. Roles of ABCB1 gene polymorphisms and haplotype in susceptibility to breast carcinoma risk and clinical outcomes. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138:1449–62.
139. Ashariati A, Djatmiko A, Iskandar A, Wati S, Redjeki S. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predict response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer with expression HER2/NEU. *Ann Oncol*. 2008;40(4):187–91.
140. Kim HJ, Im SA, Keam B, Ham HS, Lee KH, Kim TY, i in. ABCB1 polymorphism as prognostic factor in breast cancer patients treated with docetaxel and doxorubicin neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Sci*. 2015;106(1):86–93.
141. Chaturvedi P, Tulsyan S, Agarwal G, Lal P, Agarwal S, Mittal RD, i in. Influence of ABCB1 genetic variants in breast cancer treatment outcomes. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(5):754–61.
142. Pascual T, Apellániz-Ruiz M, Pernaut C, Cueto-Felgueroso C, Villalba P, Álvarez C, i in. Polymorphisms associated with everolimus pharmacokinetics, toxicity and survival in metastatic breast cancer. *PLoS One*. 2017;12(7):1–13.
143. Tsai SM, Lin CY, Wu SH, Hou LA, Ma H, Tsai LY, i in. Side effects after docetaxel treatment in Taiwanese breast cancer patients with CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 gene polymorphisms. *Clin Chim Acta*. 2009;404(2):160–5.
144. Bray J, Sludden J, Griffin MJ, Cole M, Verrill M, Jamieson D, i in. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br J Cancer*. 2010;102(6):1003–9.
145. Primer3 Input (version 0.4.0) [Internet]. Dostępne na: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>
146. Mutoh K, Tsukahara S, Mitsuhashi J, Katayama K, Sugimoto Y. Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of P-glycoprotein in MDR1-transduced human breast cancer cells. *Cancer Sci*. 2006;97(11):1198–204.
147. Scheiner MAM, da Cunha Vasconcelos F, da Matta RR, Dal Bello Figueira R, Maia RC. ABCB1 genetic variation and P-glycoprotein expression/activity in a cohort of

- Brazilian acute myeloid leukemia patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* czerwiec 2012;138(6):959–69.
148. Jassem J, Krzakowski Zespół autorski M, Krzakowski M, Bobek-Billewicz B, Duchnowska R, Jeziorski A, i in. *Rak piersi.* 2014.
 149. Weir HK, Thompson TD, Soman A, Møller B, Leadbetter S, White MC. Meeting the Healthy People 2020 Objectives to Reduce Cancer Mortality. *Prev Chronic Dis.* 2 lipiec 2015;12:140482.
 150. Kriegsmann M, Sinn HP, Bergmann M, Kühn T, Kaaks R, Sookthai D, i in. Obesity as risk factor for subtypes of breast cancer: results from a prospective cohort study. *BMC Cancer.* 2018;18(616):1–8.
 151. Główny Urząd Statystyczny. *Zdrowie i zachowanie zdrowotne mieszkańców Polski w świetle Europejskiego Ankietowanego Badania (EHIS) 2014.* 2015.
 152. Zgliczyński WS. *Nadwaga i otyłość w Polsce. INFOS Zagadnienia społeczno-gospodarcze.* 2017.
 153. Renehan AG, Soerjomataram I, Tyson M, Egger M, Zwahlen M, Coebergh JW, i in. Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries. *Int J Cancer.* 2010;126(3):692–702.
 154. Kazmi A, Sattar A, Hashim R, Khan SP, Younus M, Khan FA. Serum leptin values in the healthy obese and non-obese subjects of Rawalpindi. *J Pak Med Assoc.* 2013;63(2):245–8.
 155. Al Maskari MY, Alnaqdy AA. Correlation between serum leptin levels, body mass index and obesity in Omanis. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2006;6(2):1–5.
 156. Marcello MA, Calixto AR, De Almeida JFM, Martins MB, Cunha LL, Cavalari CAA, i in. Polymorphism in LEP and LEPR may modify leptin levels and represent risk factors for thyroid cancer. *Int J Endocrinol.* 2015;
 157. Constantin A, Glavce CS, Vladica M, Costache G, Sima A V., Constantin A, i in. Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;282–6.
 158. Lee C-H, Ko AM-S, Liu C-S, Ko Y-C, Wang T-N, Huang M-C, i in. G-2548A Polymorphism of the Leptin Gene Is Correlated with Extreme Obesity in Taiwanese Aborigines. *Obesity.* 2008;14(2):183–7.
 159. Shabana, Hasnain S. Leptin promoter variant G2548A is associated with serum leptin and HDL-C levels in a case control observational study in association with obesity in a Pakistani cohort. *J Biosci.* 2016;41:251–5.
 160. Bieńkiewicz J, Romanowicz H, Malinowski A, Smolarz B. Association of Single Nucleotide Polymorphism -2548 G/A (rs12112075) of leptin gene with endometrial cancer and uterine leiomyomas. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017;218:113–8.
 161. Hassanzadeh T, Maleki M, Saidijam M, Paoli M. Association between leptin gene G2548A polymorphism with metabolic syndrome. *J Res Med Sci.* 2013;18(8):668–73.
 162. Roszkowska-Gancarz M, Kuryłowicz A, Polosak J, Mossakowska M, Franek E, Puzianowska-Kuźnicka M. Functional polymorphisms of the leptin and leptin receptor genes are associated with longevity and with the risk of myocardial infarction and of type 2 diabetes mellitus. *Endokrynol Pol.* 2014;65:11–6.

163. Trakovická A, Moravčíková N, Candráková K, Kasarda R. Associations between LEP G2548A polymorphisms and lipids metabolism. *Acta Fytotech Zootech.* 2016;19:75–9.
164. Rostami S, Kohan L, Mohammadianpanah M. The LEP G-2548A gene polymorphism is associated with age at menarche and breast cancer susceptibility. *Gene.* 2015;557:154–7.
165. Soskic S, Stokic E, Obradovic M, Sudar E, Tanic N, Kupusinac A, i in. Association of leptin gene polymorphism G-2548A with metabolic and anthropometric parameters in obese patients in a Serbian population: Pilot study. *Clin Lipidol.* 2014;9(5):505–13.
166. Rodrigo C, Tennekoon K, Karunanayake EH, De Silva K. Circulating leptin, soluble leptin receptor, free leptin index, visfatin and selected leptin and leptin receptor gene polymorphism in sporadic breast cancer. *Endocr J.* 2017;64(4).
167. -Robles MJG. The LEP G-2548A Polymorphism is not Associated with Breast Cancer Susceptibility in Obese Western Mexican Women. *J Clin Cell Immunol.* 2013;04(01).
168. Furusawa T, Naka I, Yamauchi T, Natsuhara K, Kimura R, Nakazawa M, i in. The Q223R polymorphism in LEPR is associated with obesity in Pacific Islanders. *Hum Genet.* 2010;127:287–94.
169. Zhang S, Jiang J, Chen Z, Wang Y, Tang W, Liu C, i in. Investigation of LEP and LEPR polymorphisms with the risk of hepatocellular carcinoma: A case–control study in Eastern Chinese han population. *Onco Targets Ther.* 2018;11:2083–9.
170. Tu X, Yao L, Zhang Z, Sun Z, Gao M, Zhang Y, i in. LEPR gene polymorphism and plasma soluble leptin receptor levels are associated with polycystic ovary syndrome in Han Chinese women. *Per Med.* 2017;14(4):299–307.
171. Nowzari Z, Asadikaram G, Akbari H, Masoumi M, Shahrokhi N, Nazari-Robati M. Association of polymorphisms of leptin, leptin receptor and apelin receptor genes with susceptibility to coronary artery disease and hypertension. *Life Sci.* 2018;207:166–71.
172. Hassan NE, El-Masry SA, Zarouk W, El Banna RA, Mosaad RM, Al-Tohamy M, i in. Obesity phenotype in relation to gene polymorphism among samples of Egyptian children and their mothers. *Genes Dis.* 2018;5:150–7.
173. Abdu Allah AM, El-Hefnway SM, Alhanafy AM, Zahran AM, Kasem HE. Leptin receptor gene (A/G) polymorphism rs1137101 and renal cell carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 2018;448:137–44.
174. Guillou H, Lespine A, Bertrand-Michel J, Collet X, Martin PGP, Ménez C, i in. P-glycoprotein Dysfunction Contributes to Hepatic Steatosis and Obesity in Mice. *PLoS One.* 2011;6(9):e23614.
175. Ghanem CI, Gómez PC, Arana MC, Perassolo M, Delli Carpini G, Luquita MG, i in. Induction of Rat Intestinal P-glycoprotein by Spironolactone and Its Effect on Absorption of Orally Administered Digoxin. *J Pharmacol Exp Ther.* 23 maj 2006;318(3):1146–52.
176. Vendelbo J, Rungby J, Kleinman JE, Larsen A, Hyde TM, Olesen RH, i in. Increasing BMI is associated with reduced expression of P-glycoprotein (ABCB1 gene) in the human brain with a stronger association in African Americans than Caucasians. *Pharmacogenomics J.* 2016;18(1):121–6.
177. Jeannesson E, Siest G, Bastien B, Albertini L, Aslanidis C, Schmitz G, i in. Association of ABCB1 gene polymorphisms with plasma lipid and apolipoprotein concentrations in the STANISLAS cohort. *Clin Chim Acta.* maj 2009;403(1–2):198–202.

178. Su J, Xu H, Yang J, Yu Q, Yang S, Zhang J, i in. ABCB1 C3435T polymorphism and the lipid-lowering response in hypercholesterolemic patients on statins: A meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 2015;14(1):1–10.
179. Sałacka A, Bińczak-Kuleta A, Kaczmarczyk M, Hornowska I, Safranow K, Clark JSC. Possible association of ABCB1:c.3435T>C polymorphism with high-density-lipoprotein-cholesterol response to statin treatment - a pilot study. *Bosn J Basic Med Sci.* 2014;14(3):144.
180. Matsuo H, Yasunaga A, Kojima T, Ichihara S, Hibino T, Park H, i in. Association of a polymorphism of ABCB1 with obesity in Japanese individuals. *Genomics.* 2008;91(6):512–6.
181. Mrozikiewicz-Rakowska B, Malinowski M, Nehring P, Bartkowiak-Wieczorek J, Bogacz A, Żurawińska-Grzelka E, i in. The MDR1/ABCB1 gene rs 1045642 polymorphism in colorectal cancer. *Arch Med Sci.* 2017;13(1).
182. Adler G, Pawińska-Matecka A, Garstka A, Salkic NN, Valjevac A, Karakiewicz B. First report on the distribution of 3435C>T ABCB1/MDR1 polymorphism in healthy Bosniak population. *Turkish J Med Sci.* 2016;46(3):942–4.
183. Ravic KG, Brinar M, Ladic A, Cota M, Vucelic B, Markos P, i in. MDR1 polymorphisms are associated with inflammatory bowel disease in a cohort of Croatian IBD patients. *BMC Gastroenterol.* 2013;13:1–7.
184. Palmieri O, Latiano A, Valvano R, D’Inca R, Vecchi M, Sturniolo GC, i in. Multidrug resistance 1 gene polymorphisms are not associated with inflammatory bowel disease and response to therapy in Italian patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22(11–12):1129–38.
185. Buch S, Försti A, Barale R, Brenner H, Vodickova L, Campa D, i in. A Comprehensive Investigation on Common Polymorphisms in the MDR1/ABCB1 Transporter Gene and Susceptibility to Colorectal Cancer. *PLoS One.* 2012;7(3):e32784.
186. Chakrabarti T, Devi S, Krishnamurthi K, Surendran ST, Pramanik S. Frequency and genotype distribution of ABCB1 gene polymorphisms among Maharashtrian population of Central India . *Xenobiotica.* 2013;44(6):579–82.
187. Keshavarz-Maleki R, Ahangar N. Evaluation of G2677T/A polymorphism of MDR1 gene by polymerase chain reaction in Mazandaran province, Iran. *Pharm Biomed Res.* 2016;1(2):54–63.
188. Caron A, Lee S, Elmquist JK, Gautron L. Leptin and brain-adipose crosstalk. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19:153–65.
189. El-Hussiny MAB, Atwa MA, Rashad WE, Shaheen DA, Elkady NM. Leptin receptor Q223R polymorphism in Egyptian female patients with breast cancer. *Wspolczesna Onkol.* 2017;21(1):42–7.
190. Han CZ, Du LL, Jing JX, Zhao XW, Tian FG, Shi J, i in. Associations among lipids, leptin, and leptin receptor gene gin223arg polymorphisms and breast cancer in China. *Biol Trace Elem Res.* 2008;126:38–48.
191. Dallal C, Garte S, Ragin C, Chen J, Lloyd S, Modugno F, i in. Plasma leptin levels, LEPR q223R polymorphism and mammographic breast density: A cross-sectional study. *Int J Biol Markers.* 2013;28(2):161–7.

192. Yuan XL, Xu ZP, Liu CR, Yan LP, Tao P, Xiong P, i in. Study of the association between polymorphism of persistent obesity, human leptin gene/leptin receptor gene and molecular subtypes of breast cancer. *Chinese J Prev Med.* 2017;51(6):533–8.
193. Terrasi M, Fiorio E, Mercanti A, Koda M, Moncada CA, Sulkowski S, i in. Functional analysis of the -2548G/A leptin gene polymorphism in breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2009;125:1038–44.
194. Hołysz H, Rubiś B. Contribution of ABCB1 gene polymorphisms to breast cancer cells response to chemotherapy. *Menopausal Rev.* 2013;4(4):321–7.
195. Tazzite A, Nadifi S, Kassogue Y, Benider A, Diakitè B, Dehbi H, i in. Association between ABCB1 C3435T polymorphism and breast cancer risk: a Moroccan case-control study and meta-analysis. *BMC Genet.* 2016;17(126):1–11.
196. Jaramillo-Rangel G, Ortega-Martínez M, Cerda-Flores RM, Barrera-Saldaña HA. Original Article C3435T polymorphism in the MDR1 gene and breast cancer risk in northeastern Mexico. T. 11, *Int J Clin Exp Pathol.* 2018.
197. de Azevedo Delou JM, Vignal GM, Índio-do-Brasil V, de Souza Accioly MT, da Silva TSL, Piranda DN, i in. Loss of constitutive ABCB1 expression in breast cancer associated with worse prognosis. *Breast Cancer Targets Ther.* 2017;9:415–8.
198. El-Madany NN, Bulatova NR, Yousef A-MF, Awwad NM, Al Majdalawi KZ, Yousef MA, i in. Influence of Genotype and Haplotype of MDR1 (C3435T, G2677A/T, C1236T) on the Incidence of Breast Cancer - a Case-Control Study in Jordan. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2016;17(1):261–6.
199. Jenks MZ, Fairfield HE, Johnson EC, Morrison RF, Muday GK. Sex Steroid Hormones Regulate Leptin Transcript Accumulation and Protein Secretion in 3T3-L1 Cells. *Sci Rep.* 15 grudzień 2017;7(1):8232.
200. Giordano C, Barone I, Bonofiglio D, Gelsomino L, Panza S, Catalano S, i in. Obesity, Leptin and Breast Cancer: Epidemiological Evidence and Proposed Mechanisms. *Cancers (Basel).* 2019;11(62):1–27.
201. Raut PK, Choi DY, Kim SH, Hong JT, Kwon TK, Jeong JH, i in. Estrogen receptor signaling mediates leptin-induced growth of breast cancer cells via autophagy induction. *Oncotarget.* 12 grudzień 2017;8(65):109417–35.
202. Giordano C, Vizza D, Panza S, Barone I, Bonofiglio D, Lanzino M, i in. Leptin increases HER2 protein levels through a STAT3-mediated up-regulation of Hsp90 in breast cancer cells. *Mol Oncol.* 2013;7:379–91.
203. Molino A, Di Stefano B, Mercanti A, Giordano A, Bonetti F, Parolin V, i in. Leptin/HER2 crosstalk in breast cancer: in vitro study and preliminary in vivo analysis. *BMC Cancer.* 2008;8(305).
204. Kim Y, Kim S-Y, Jin Lee J, Seo J, Kim Y-W, Hwan Koh S, i in. Effects of the Expression of Leptin and Leptin Receptor (OBR) on the Prognosis of Early-stage Breast Cancers. T. 38, *Cancer Res Treat.* 2006.
205. Tang Y, Wang Y, Deosarkar S, Soroush F, Kiani MF, Wang B. Fast, stable induction of P-glycoprotein-mediated drug resistance in BT-474 breast cancer cells by stable transfection of ABCB1 gene. *Anticancer Res.* 2015;35:2513–38.

206. Li W, Zhai B, Zhi H, Li Y, Jia L, Ding C, i in. Association of ABCB1, β tubulin I, and III with multidrug resistance of MCF7/DOC subline from breast cancer cell line MCF7. *Tumor Biol.* 2014;35(9):8883–91.
207. Oba T, Izumi H, Ito K. ABCB1 and ABCC11 confer resistance to eribulin in breast cancer cell lines. *Oncotarget.* 2016;7(43):70011–27.
208. Bao L, Hazari S, Mehra S, Kaushal D, Moroz K, Dash S. Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. *Am J Pathol.* 2012;180(6):2490–503.
209. Qiao D, Tang S, Aslam S, Ahmad M, To KKW, Wang F, i in. UMMS-4 enhanced sensitivity of chemotherapeutic agents to ABCB1-overexpressing cells via inhibiting function of ABCB1 transporter. *Am J Cancer Res.* 2014;4(2):148–60.
210. ATCC. Passage Number Effects In Cell Lines. T. 7, Tech Bulletin no.7. 2010.
211. Eckalbar WL, Kreimer A, Ryu AH, Ahituv N, Yosef N. Use antibiotics in cell culture with caution: genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–9.
212. Jabłoński AJAB, Zębek S, Mokrzycka A. Wybrane mechanizmy oporności bakterii na chemioterapeutyki. 2010;66(7):449–52.
213. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer.* 2018;18(1):41.
214. Gericke B, Noack S, Gerhauser I, Noack A, Naim HY, Menze A, i in. Mechanism of drug extrusion by brain endothelial cells via lysosomal drug trapping and disposal by neutrophils. *Proc Natl Acad Sci.* 2018;115(41):9590–9.
215. Martín R, Paniagua R, Polak JM, Santamaría L, Fraile B. Ultrastructural localization of PGP 9.5 and ubiquitin immunoreactivities in rat ductus epididymidis epithelium. *Histochem J.* 1995;27:431–9.
216. Kopecka J, Rankin GM, Salaroglio IC, Poulsen S-A, Riganti C. P-glycoprotein-mediated chemoresistance is reversed by carbonic anhydrase XII inhibitors. *Oncotarget.* 2016;7(52):85861–75.
217. Rusetskaya N V., Lukyanova NY, Chekhun VF. Molecular profile and cell cycle in MCF-7 and MCF-7/Dox cells exposed to conventional and liposomal forms of doxorubicin. *Exp Oncol.* 2009;31(3):140–3.
218. Fang XJ, Jiang H, Zhu YQ, Zhang LY, Fan QH, Tian Y. Doxorubicin induces drug resistance and expression of the novel CD44st via NF- κ B in human breast cancer MCF-7 cells. *Oncol Rep.* 2014;31(6):2735–42.
219. Mealey KL, Barhoumi R, Burghardt RC, Safe S, Kochevar DT. Doxycycline induces expression of P glycoprotein in MCF-7 breast carcinoma cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(3):755–61.
220. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, i in. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics.* 2011;21(3):152–61.
221. Zhang YT, Yang LP, Shao H, Li KX, Sun CH, Shi LW. ABCB1 polymorphisms may have a minor effect on ciclosporin blood concentrations in myasthenia gravis patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;66(2):240–6.

222. Yamauchi A, Ieiri I, Kataoka Y, Tanabe M, Nishizaki T, Oishi R, i in. Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation*. 2002;74(4):571–8.
223. Oselin K, Gerloff T, Mrozikiewicz PM, Pähkla R, Roots I. MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003;17:463–9.
224. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schäffeler E, Fischer J, Schwab M, i in. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics*. 2001;11(4):293–8.
225. Zhu D, Taguchi-Nakamura H, Goto M, Odawara T, Nakamura T, Yamada H, i in. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther*. 2004;9(6):929–35.

10. Załączniki

10.1. Opinia Komisji Bioetycznej Działającej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 568/18

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentyisty (t.j. Dz. U. z 2017, poz. 125 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2016, poz. 2142 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem mutoleńców (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niepożądanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. i w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 16 maja 2018 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: prof. dr hab. Maria Rybczyńska

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: mgr anal. med. Hanna Hołysz

Członkowie zespołu

badawczego:

**Aleksandra Romaniuk
dr n. farm. Natalia Lisiak
dr n. farm. Anna Paszeł-Jaworska**

Temat badań:

„Badanie udziału polimorfizmów genów w patogenezie raka piersi”.

Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu poprawek wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na zmianie tematu badawczego z „Badanie udziału polimorfizmów genu ABCG2 w patogenezie raka piersi” na powyższy oraz zmianie w składzie zespołu badawczego (jak wyżej), zgodnie z Anekssem nr 1 z dnia 16.05.2018 r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 145/11 z dnia 17.02.2011r.

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

Podpisy członków Komisji Bioetycznej podejmujących Uchwałę nr z dnia 16.05.2018r.

568/18

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy	Podpis
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UMP, ZOZ MSWiA, ul. Dojazd 34, 60-631 Poznań.	
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wisniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, 61-614 Poznań.	
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UMP, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań	
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Kancelaria Rady Prawnego, dr Krystyna Babiak, ul. Czartoria 1/2, 61-102 Poznań.	-----
5.	ks. prof. dr hab. Andrzej Bohdanowicz	teologia	Wydział Teologiczny Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Wieszowa 2/4, Poznań	
6.	prof. dr hab. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
7.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjść Pediatry Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
8.	mgr Krystyna Malinger	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
9.	prof. dr hab. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów UMP, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań.	
10.	prof. dr hab. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Zakład Zdrowia Publicznego UMP, ul. Dąbrowskiego 79, 60-529 Poznań.	
11.	prof. dr hab. Wojciech Stulewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
12.	prof. dr hab. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
13.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UMP, ul. Szamarzewskiego 82/84, 60-569 Poznań.	
14.	prof. dr hab. Joanna Twarowska- Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Wyższa Szkoła Pedagogiki i Administracji im. Mieszka I w Poznaniu, ul. Bułgarska 55, 60-320 Poznań.	



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 309/10

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczególnych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczególnych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań nieopóźnionego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkwalifikacyjnych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Pravidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 08 kwietnia 2010r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:

prof. dr hab. Maria Rybczyńska

w sprawie prowadzenia badań w

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej UM w Poznaniu

Główny badacz: Wojciech Barczak

Członkowie zespołu

badawczego:

Karolina Szymczak

Paulina Sawicka

Marta Gładych

Temat

badania: "Badanie udziału polimorfizmów genu ABCB1 oraz BCRP w patogenezie raka piersi".

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

LISTA OBECNOŚCI

**KOMISJI BIOETYCZNEJ
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCYNIM IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU**

Posiedzenie Komisji dnia: **08 KWIETNIA 2010 r.**

Przewodniczący: prof. zw. dr hab. ZYGMUNT PRZYBYLSKI

Zastępca
Przewodniczącego: prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI

Członkowie: prof. dr hab. ROMAN SZULC

prof. dr hab. JANUSZ SZYMAŚ

prof. dr hab. WOJCIECH SŁUŻEWSKI

prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI

prof. UM dr hab. MACIEJ KRAWCZYŃSKI

dr hab. n. med. ROBERT SPACZYŃSKI

dr med. PIOTR TOMCZAK

prof. dr hab. PAWEŁ CHEĆIŃSKI

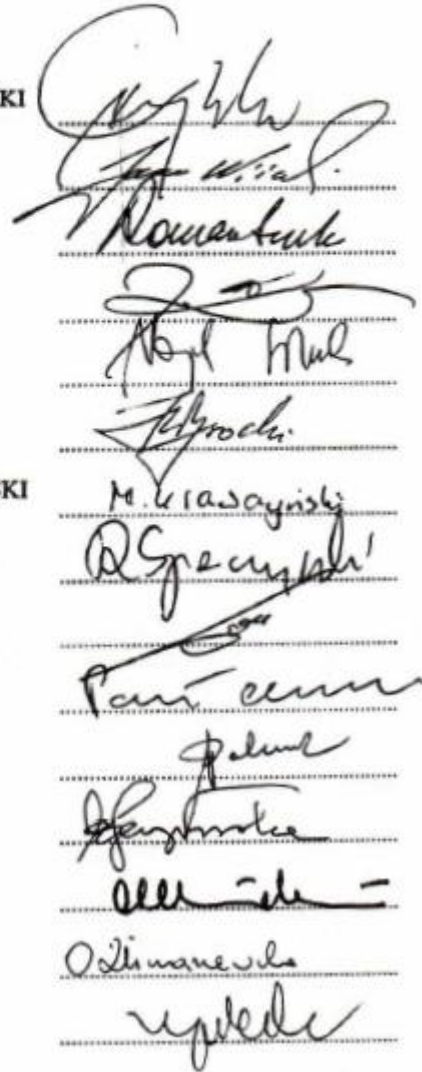
prof. dr hab. JANUSZ PALUSZAK

ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA

dr hab. JERZY W. OCHMAŃSKI

dr farm. OLIMPIA KLIMASZEWSKA

BARBARA LIPIAK


The right side of the document contains handwritten signatures of the commission members, each written on a set of horizontal lines. The signatures are: Zygmunt Przybylski, Janusz Wiśniewski, Roman Szulc, Janusz Szymaś, Wojciech Służewski, Henryk Wysocki, Maciej Krawczyński, Robert Spaczyński, Piotr Tomczak, Paweł Chęciński, Janusz Paluszak, Jerzy Troška, Jerzy W. Ochmański, Olimpia Klimaszewska, and Barbara Lipiak.

10.2. Wzór formularza świadomej zgody pacjenta

FORMLARZ INFORMACJI I ŚWIADOMEJ ZGODY PACJENTA

Wyrażam zgodę na wykorzystanie mojej krwi pozostałej po wykonaniu planowanych badań laboratoryjnych (materiał resztkowy), do badań naukowych prowadzonych przez Studenckie Koło Naukowe „Biosfera” (opiekun koła: dr hab. Błażej Rubiś, prof. UMP) w ramach realizacji tematu: Badanie udziału polimorfizmu genów w patogenezie raka piersi.

Rok urodzenia.....

Wzrost.....

Waga.....

Przebyte choroby (nowotwór, cukrzyca, nadciśnienie itp.)

.....

.....

.....

Przebyte choroby wśród członków rodziny (nowotwór, cukrzyca, nadciśnienie itp.).....

.....

.....

Data

Podpis

.....