

AUTOREFERAT

I. Imię i nazwisko

Aleksandra Sałagacka-Kubiak

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 22.06.2005 | tytuł magistra analityki medycznej (z wyróżnieniem),
Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi |
| 23.11.2005 | prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego (nr 10752),
Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych |
| 29.09.2009 | stopień doktora nauk farmaceutycznych, specjalność biologia
molekularna; rozprawa doktorska pt.: „Ekspresja genu <i>ABCG2</i> i
białka oporności raka piersi (BCRP) jako potencjalnych czynników
prognostycznych w raku jelita grubego” (promotor: prof. dr hab.
Marek Mirowski).
Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi |
| 11.12.2014 | tytuł specjalisty w dziedzinie laboratoryjnej genetyki medycznej
(kierownik specjalizacji: dr hab. n. med. prof. nadzw. Lucjusz
Jakubowski) |

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- | | |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10.2008 – 09.2011 | asystent – Pracownia Biologii Molekularnej i Farmakogenomiki
Zakład Biochemii Farmaceutycznej Katedry Chemii
Farmaceutycznej i Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi |
| 10.2011 - obecnie | adiunkt – Pracownia Diagnostyki Molekularnej i
Farmakogenomiki, Zakład Biochemii Farmaceutycznej i
Diagnostyki Molekularnej Międzywydziałowej Katedry
Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej Uniwersytetu
Medycznego w Łodzi (wcześniej Pracownia Biologii
Molekularnej, Zakład Biochemii Farmaceutycznej Katedry
Chemii Farmaceutycznej i Biochemii) |

IV. Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Wpływ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów i ekspresji wybranych genów na ryzyko rozwoju choroby wrzodowej

Badania wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego stanowią cykl sześciu prac oryginalnych. We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem. Łączna wartość współczynnika *impact factor* (IF) dla prezentowanego cyklu prac wynosi 7,362; punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW): 105 punktów.

Pracę wykonałam w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki, znajdującej się w strukturze Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej, kierowanej przez dr hab. prof. nadzw. UM Ewę Balcerczak; kierownik zakładu - prof. dr hab. Marek Mirowski.

b) Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe

- O1 Sałańska A, Bartczak M, Żebrowska M, Jażdżyk M, Balcerczak M, Janiuk R, Mirowski M, Balcerczak E. C3435T polymorphism of *ABCB1* gene: impact on genetic susceptibility to peptic ulcer. *Pharmacological Reports* 2011, 63: 992-8
IF= 2,445/MNiSW: 25
- O2 Sałańska A, Żebrowska M, Balcerczak M, Mirowski M, Balcerczak E. Haplotype analysis of *ABCB1* in patients with peptic ulcer – predisposition to diseases development. *International Journal of Human Genetics*, 2013, 13: 189-94
IF= 0,155/MNiSW: 15
- O3 Sałańska A, Żebrowska M, Jeleń A, Mirowski M, Balcerczak E. Investigation of -308G>A and -1031T>C Polymorphisms of *TNFA* Promoter Region in Polish Peptic Ulcer Patients. *Gut And Liver* 2014; 8: 632-6
IF=1,810/MNiSW: 15
- O4 Sałańska-Kubiak A, Żebrowska M, Jeleń A, Mirowski M, Balcerczak E. Assessment of *TNFA* polymorphisms at positions -857 and -863 in Polish peptic ulcer patients. *Advances in Medical Sciences* 2016, 61: Available online 18 December 2015
IF=1,105/MNiSW: 15
- O5 Sałańska A, Żebrowska M, Jeleń A, Mirowski M, Balcerczak E. Haplotype Analysis of *TNFA* Gene in Peptic Ulcer Patients. *International Journal of Human Genetics* 2014, 14: 9-15
IF=0,370/MNiSW: 15
- O6 Sałańska-Kubiak A, Żebrowska M, Wosiak A, Balcerczak M, Mirowski M, Balcerczak E. *ABCG2* in peptic ulcer: gene expression and mutation analysis. *Journal of Applied Genetics* published on-line 17 November 2015
IF=1,477/MNiSW: 20

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Choroba wrzodowa jest jedną z najczęstszych chorób przewodu pokarmowego. Do 20% chorych doświadcza poważnych, niekiedy zagrażających życiu powikłań wrzodów jak krwawienie z górnego odcinka przewodu pokarmowego, perforacja wrzodu czy zwężenie odźwiernika (Szczeklik, 2005; Januszkiewicz, Kokot, 2004). Obecnie w patogenezie choroby wrzodowej podkreśla się znaczenie zaburzonej równowagi między czynnikami drażniącymi i czynnikami o charakterze ochronnym, które wpływają na kondycję błony śluzowej żołądka i dwunastnicy (Malfertheiner i wsp., 2009). Przewaga oddziaływania tych pierwszych prowadzi do zapalenia, a następnie do uszkodzenia błony śluzowej. Należą do nich czynniki środowiskowe i genetyczne. Najważniejsze czynniki środowiskowe to niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) i zakażenie *Helicobacter pylori* (Schabowski, 2002; Thorsen i wsp., 2013).

Helicobacter pylori jest przyczyną ponad 90% przypadków wrzodów dwunastnicy i 70-80% wrzodów żołądka (Szczeklik, 2005). W Polsce zakażonych jest ponad połowa dorosłych i około 1/3 dzieci. Mimo to symptomy choroby rozwijają się tylko u 10-15% z nich. Co więcej, różne osoby mogą po zakażeniu tym samym szczepem bakteryjnym odpowiadać różną intensywnością i rodzajem zmian zapalnych w żołądku. Nie poznano w pełni przyczyn tego zjawiska. Sądzi się, że znaczenie mają współistniejące choroby, styl życia, ale również czynniki genetyczne. Jako potencjalne czynniki genetyczne wpływające na osobniczą podatność na chorobę wrzodową bierze się aktualnie pod uwagę zmiany w strukturze (polimorfizmy), jak i ekspresji genów odpowiedzialnych za ochronę błony śluzowej przed czynnikami drażniącymi oraz tych zaangażowanych w procesy zapalne i odpowiedź immunologiczną.

Błona śluzowa przewodu pokarmowego chroniona jest fizjologicznie poprzez występowanie w komórkach jej nabłonka transporterów, których rolą jest ograniczanie przedostawania się do wnętrza tych komórek substancji toksycznych znajdujących się w treści pokarmowej, jak i usuwanie z nich endotoksyn powstających w trakcie procesów metabolicznych. Do najważniejszych transporterów tego typu należą białka z nadrodziny ABC - ang. *ATP-binding cassette transporters* (Szakács G i wsp., 2008). Jednym z najlepiej poznanych transporterów ABC jest glikoproteina P (P-gp), kodowana przez gen *ABCB1*. P-gp jest obecna fizjologicznie na powierzchni komórek prawidłowych organów wydzielniczych (jelita, wątroba, nerki), powierzchni błony śluzowej przewodu pokarmowego. Istnieją silne dowody na to, że P-gp odgrywa istotną rolę w utrzymywaniu homeostazy w przewodzie pokarmowym. Interakcja między toksynami bakteryjnymi (np. wytwarzanymi przez *H. pylori*) i karcynogenami z pożywienia a błoną śluzową żołądka może prowadzić do przewlekłej choroby wrzodowej i kancerogenezy w tym narządzie. P-gp transportuje także wiele leków stosowanych w eradykacji *H. pylori* (Sugimoto i wsp., 2007). Brak efektywności leczenia eradykacyjnego spowodowany nadekspresją glikoproteiny P może prowadzić

do przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka i dwunastnicy i sprzyjać nowotworzeniu.

Przeszukiwanie genu *ABCB1* pozwoliło na zidentyfikowanie licznych jego polimorfizmów, które są związane ze zmienioną funkcją transportową i/lub ekspresją P-gp. Substytucja cytozyny na tyminę w pozycji 3435 genu *ABCB1* może skutkować zmianą w ekspresji tego genu i, co za tym idzie, zmianą ilości syntetyzowanej glikoproteiny P. Wykazano, że istnieje związek między polimorfizmem 3435C>T a predyspozycją do występowania m.in. ostrej białaczki limfoblastycznej, szpiczaka mnogiego, raka nerek i raka jelita grubego (Jamrozak i wsp., 2004; Jamrozak i wsp., 2009; Siegsmond i wsp., 2002, Panczyk i wsp., 2009, Osswald i wsp., 2007), jak również wynikami i toksycznością leczenia za pomocą substratów P-gp (Frederiks i wsp., 2015; Tulsyan i wsp., 2016).

Mniej poznanym niż *ABCB1* transporterem ABC jest białko *ABCG2*, zwane także białkiem oporności raka piersi (ang. *breast cancer resistance protein*, BCRP) (Doyle i wsp., 1998), obecne w tkankach mózgu i bariery krew-mózg, prostatie, jajnikach, jądrach, nadnerczach. W przewodzie pokarmowym białko *ABCG2* jest zlokalizowane w apikalnej części błony komórek, co potwierdza jego rolę ochronną poprzez ograniczanie kumulowania się ksenobiotyków w nabłonku. Tak, jak *ABCB1*, także gen *ABCG2* jest wysoce polimorficzny. Zmiany w *ABCG2*, np. polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs), jak i zmiany w poziomie jego ekspresji mogą zmieniać ilość i/lub funkcję białka *ABCG2*. Jednym z takich polimorfizmów jest C421A skutkujący zamianą glutaminy na lizynę w pozycji 141 białka *ABCG2* (Cusatis i wsp., 2006) oraz niższą ekspresją i niższą aktywnością transportową *ABCG2* (Imai i wsp., 2002; Kondo i wsp., 2004; Mizurai i wsp., 2004). To może powodować utratę jego funkcji ochronnej, a przez to promować powstawanie choroby wrzodowej (Mao i wsp., 2005; Mo i wsp., 2012; Liu i wsp., 2013).

Kluczowym elementem patogenezy choroby wrzodowej jest proces zapalny wyzwalany bądź przez bezpośrednio drażniące czynniki chemiczne (np. NLPZ), bądź przez kolonizującą błonę śluzową *Helicobacter pylori*. Bakteria dodatkowo wywołuje odpowiedź ze strony zarówno wrodzonych, jak i nabytych mechanizmów odporności. Modulacja nasilenia odpowiedzi immunologicznej i zapalnej poprzez zróżnicowanie ilości wytwarzanych cytokin pro- i przeciwzapalnych (m.in. TNF- α , IL-1 β , IL-8, INF- γ) ma istotne znaczenie w patogenezie choroby wrzodowej, a szczególnie w przypadku przebiegu infekcji *H. pylori*. Różnice w ich stężeniu i/lub aktywności wpływające na przebieg wymienionych procesów wynikać mogą z polimorfizmu genów kodujących te cytokiny. Dowiedziono, że polimorfizmy genów dla IL-1B, IL-8, IL-10, TNF- α są związane z zakażeniem *H. pylori*, atrofią żołądka i rakiem żołądka (Hishida i wsp., 2010; Sugimoto i wsp., 2010).

Do najistotniejszych cytokin biorących udział w patomechanizmie choroby wrzodowej należy czynnik martwicy nowotworów alfa (ang. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α). W błonie śluzowej żołądka zainfekowanej *H. pylori* nasila napływ do niej komórek jednojądrzastych i neutrofili. Jednak nadmierna produkcja TNF- α może mieć patogenne działanie. Jest wiązana z takimi schorzeniami wywoływanymi przez

H. pylori jak zapalenie żołądka, choroba wrzodowa, metaplasja jelitowa i rak żołądka (Goto, 2003). Stwierdzono również, że substancje zmniejszające stężenie TNF- α w błonie śluzowej żołądka zapobiegają jej uszkodzeniu pod wpływem indometacyny (Ding i wsp., 1998), co wskazuje na istotną rolę tej cytokiny w patogenezie choroby wrzodowej wywoływanej przez NLPZ.

Synteza TNF- α jest regulowana na poziomie transkrypcyjnym poprzez oddziaływanie licznych czynników transkrypcyjnych z promotorem *TNFA* (Falvo i wsp., 2010). Istotną rolę w regulacji ekspresji *TNFA* przypisuje się polimorfizmom jego regionu promotorowego w pozycjach -1031 -863, -857, -308, -238. Ze względu na to, że polimorfizmy te mogą determinować osobnicze różnice w ilości wytwarzanego TNF- α podczas rozwoju choroby wrzodowej, są one badane jako potencjalne genetyczne czynniki ryzyka tego schorzenia, jak i innych chorób wywoływanych przez *H. pylori* (Lee i wsp., 2004; Wilschanski i wsp., 2007; Kim i wsp., 2006; Canedo i wsp., 2008).

Cele badań

- I. Poszukiwanie związku między ryzykiem rozwoju choroby wrzodowej, jak również rozwojem zakażenia *Helicobacter pylori* u osób z chorobą wrzodową a występowaniem polimorfizmów pojedynczych nukleotydów:
 - genu *ABCB1*: 3435C>T (rs1045642) **(O1)**
 - genu *TNFA*: -308G>A (rs1800629) **(O3)**, -857C>T (rs1799724) **(O4)**, -863C>T (rs18000630) **(O4)**, -1031 (rs1799964) **(O3)**,
 - genu *ABCG2*: C421A (rs2231142) **(O6)**.
- II. Rekonstrukcja haplotypów *ABCB1* **(O2)** i *TNFA* **(O5)**, oszacowanie ich częstości w badanych populacjach oraz poszukiwanie związku między ryzykiem rozwoju choroby wrzodowej, jak również między rozwojem zakażenia *Helicobacter pylori* u osób z chorobą wrzodową a występowaniem tych haplotypów.
- III. Ocena ekspresji *ABCG2* u osób z chorobą wrzodową i poszukiwanie związku między obecnością i poziomem tej ekspresji a cechami klinicznymi, obecnością i intensywnością zakażenia *Helicobacter pylori* **(O6)**.

Charakterystyka badań i omówienie uzyskanych wyników

O1 Sałagacka A, Bartczak M, Żebrowska M, Jazdzyk M, Balcerczak M, Janiuk R, Mirowski M, Balcerczak E, 2011, C3435T polymorphism of *ABCB1* gene: impact on genetic susceptibility to peptic ulcer, *Pharmacological Reports*, 63: 992-8

W pierwszej etapie moich badań poszukiwałam związku między funkcjonalnym polimorfizmem pojedynczego nukleotydu 3435C>T (rs1045642) genu *ABCB1* a ryzykiem rozwoju choroby wrzodowej, jak również związku między wspomnianym

polimorfizmem a rozwojem zakażenia *Helicobacter pylori* u osób z chorobą wrzodową.

Dokonałam oceny polimorfizmu 3435C>T u łącznie 196 pacjentów z chorobą wrzodową, zarówno zakażonych, jak i niezakażonych *H. pylori*, oraz u 96 osób zdrowych (bez choroby wrzodowej). DNA poddawane analizie zostało wyizolowane metodą kolumnkową z bioptatów błony śluzowej żołądka (grupa badana) oraz z prób krwi obwodowej (grupa kontrolna). Stężenie i czystość uzyskanych izolatów DNA oceniono spektrofotometrycznie. Genotypowanie przeprowadzono posługując się techniką PCR-RFLP (ang. *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*), w której fragment genu *ABCB1* obejmujący miejsce polimorficzne został powielony w reakcji łańcuchowej polimerazy, a tak uzyskane amplikony poddawane były trawieniu odpowiednią endonukleazą restrykcyjną. Enzym ten posiada zdolność do przecinania nici amplikonu jedynie w przypadku, gdy ta zawiera T w pozycji 3435. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym otrzymywanych po trawieniu fragmentów DNA pozwolił na ocenę genotypu badanych osób.

Uzyskane częstości genotypów dla polimorfizmu 3435 nie odbiegały istotnie od częstości wynikających z reguły Hardy'ego i Weinberga, co potwierdziło reprezentatywność wykorzystywanej próby chorych dla badanej populacji. W badaniu wykazałam istnienie tendencji do częstszego występowania genotypu 3435 TT oraz częstszego występowania allele 3435 T wśród osób z chorobą wrzodową względem osób zdrowych. W wielu wcześniejszych badaniach dotyczących wpływu polimorfizmu 3435C>T na funkcjonowanie P-gp stwierdzono, że osoby homozygotyczne pod względem allele T mają niższą ekspresję i/lub aktywność P-gp w prawidłowych tkankach (Ameyaw i wsp., 2001; Hitzl i wsp., 2001; Tanabe i wsp., 2001). Ponieważ genotyp TT jest związany z niższą ekspresją P-gp, nosiciele allele T mogą być z tego względu bardziej podatni na działanie czynników uszkadzających komórki, m.in. błony śluzowej przewodu pokarmowego. Mogłoby to wyjaśniać częstsze występowanie nosicieli allele T wśród osób z chorobą wrzodową.

Stwierdzono także, że istnieje zależność między częstością poszczególnych genotypów 3435 a występowaniem zakażenia *H. pylori* wśród osób z chorobą wrzodową. Genotyp CT wiązał się z około półtorakrotnie, a genotyp TT z około dwu i półkrotnie większym ryzykiem wystąpienia zakażenia w porównaniu z genotypem CC. Poza powierzchnią luminalną organów wydzielniczych i barier tkankowych, P-gp ulega konstytutywnej ekspresji na powierzchni komórek NK (ang. *natural killers*), prezentujących antygeny komórek dendrytycznych oraz limfocytów T i B. Zablockowanie aktywności P-gp lub zmniejszenie jej ekspresji prowadzi do zmniejszenia aktywności cytolitycznej komórek NK i limfocytów T CD8⁺ (Johnstone RW i wsp., 2000). Ponadto, P-gp jako transporter cytokin, m.in. IL-1 β , IL-2, IL-4, INF- γ , TNF- α (Mizutani i wsp., 2008), jest zaangażowana w proces migracji przelnikowatej komórek dendrytycznych i limfocytów T w czasie odpowiedzi immunologicznej (Randolph i wsp., 1998) i może na tej drodze proces ten regulować. Uzyskane w badaniu zależności między częstością poszczególnych genotypów 3435 skutkujących różną ekspresją P-gp a podatnością na zakażenie *H. pylori* u badanych

osób mogą zatem być wynikiem wpływu tych genotypów na nasilenie odpowiedzi immunologicznej i przez to na podatność na przewlekłe zakażenie wywołane przez drobnoustroje. Analogiczna analiza przeprowadzona w podgrupach chorych kobiet i mężczyzn, potwierdziła istnienie wspomnianej zależności tylko wśród mężczyzn.

W świetle uzyskanych przeze mnie wyników badań, polimorfizm *ABCB1* może stanowić wrodzony element patogenezы choroby wrzodowej. Wykazany zwiększony odsetek osób z genotypem TT wśród osób z chorobą wrzodową może zostać potencjalnie wykorzystany do przewidywania podatności poszczególnych osób na rozwój choroby wrzodowej i rozwój zakażenia *H. pylori*. Co więcej, do substratów transportera *ABCB1* należą m.in. inhibitory pompy protonowej, stosowane w eradykacji *H. pylori*. Wykazano, że genotyp 3435TT jest częstszy wśród osób wyleczonych po pierwszym cyklu terapii potrójnej, a polimorfizm 3435 wraz z polimorfizmem CYP2C19 są wskazywane jako niezależne predyktory efektywności tej terapii, zawierającej inhibitory pompy protonowej (Gawrońska-Szklarz i wsp., 2005).

O2 Salagacka A, Zebrowska M, Balcerczak M, Mirowski M, Balcerczak E, 2013, Haplotype analysis of *ABCB1* in patients with peptic ulcer – predisposition to diseases development, *International Journal of Human Genetics*, 13: 189-9

Polimorfizm *ABCB1* 3435C>T jest nazywany „cichym”, gdyż nie skutkuje on zmianą sekwencji aminokwasowej kodowanej glikoproteiny P. Mimo to, w licznych badaniach wykazano jego związek z poziomem ekspresji *ABCB1* i/lub funkcjonowaniem glikoproteiny P (Ameyaw i wsp., 2001; Hitzl i wsp., 2001; Tanabe i wsp., 2001). Jedną z hipotez wyjaśnia to zjawisko sprzężeniem polimorfizmu 3435 z innymi polimorfizmami *ABCB1*.

Wykorzystując wcześniej omówione wyniki badania dotyczącego polimorfizmu 3435 (O1) oraz rezultaty genotypowania *ABCB1* dla polimorfizmów 1236C>T (rs1128503) i 2677G>T/A (rs2032582) w tych samych grupach osób chorych i zdrowych (JCR 7) oszacowałam częstości poszczególnych haplotypów *ABCB1*_{1236_2677_3435}. W tym celu posłużyłam się programem PHASE v.2.1, który na bazie statystyki Bayesa, pozwala na rekonstrukcję haplotypów na podstawie wyników niezależnego genotypowania kilku różnych *loci*. W poddanej analizie grupie 202 osób z chorobą wrzodową najwyższą oszacowaną częstość miał haplotyp C₁₂₃₆-G₂₆₇₇-T₃₄₃₅ (14,9%), natomiast w grupie osób zdrowych haplotyp C₁₂₃₆-G₂₆₇₇-C₃₄₃₅ (19,1%). Drugi co do częstości haplotyp T₁₂₃₆-T₂₆₇₇-T₃₄₃₅ w grupie badanej (14,3%) był jednocześnie najrzadszym w grupie kontrolnej (7,6%). Grupy osób z chorobą wrzodową i zdrowych różniły się istotnie statystycznie częstością haplotypów *ABCB1*. Wykazana zależność potwierdza hipotezę o zaangażowaniu *ABCB1* w patomechanizm rozwoju choroby wrzodowej.

W dalszej części badania, aby ocenić znaczenie struktury haplotypowej *ABCB1* w rozwoju zakażenia *H. pylori* u osób z chorobą wrzodową, przeprowadziłam rekonstrukcję i oszacowanie częstości haplotypów *ABCB1* w podgrupach pacjentów

zakażonych i niezakażonych *H. pylori*. Wykazałam istnienie istotnej statystycznej różnicy w częstości haplotypów *ABCB1* między tymi podgrupami. Uzyskany wynik potwierdza hipotezę, że *ABCB1* jest istotny w rozwoju zakażenia *H. pylori* w przebiegu choroby wrzodowej. Analogicznie, jak we wspomnianym wcześniej badaniu polimorfizmu 3435, przeprowadziłam dodatkową analizę haplotypową w podgrupie chorych mężczyzn oraz w podgrupie chorych kobiet. Porównanie częstości haplotypów *ABCB1* między mężczyznami z chorobą wrzodową zakażonymi i niezakażonymi *H. pylori* potwierdziło istnienie istotnej zależności między statusem zakażenia a częstością haplotypów. Nie wykazałam natomiast, analogicznie jak w badaniu polimorfizmu 3435, takiej zależności wśród chorych kobiet.

Poza oszacowaniem częstości haplotypów *ABCB1*, oceniłam także siłę sprzężenia między analizowanymi *loci* *ABCB1*. Za pomocą programu EMLD, który jest implementacją algorytmu EM (ang. *the Expectation-Maximization Algorithm*) oceniłam stopień niezrównoważenia sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*, LD) między *loci* 1236, 2677 i 3435 genu *ABCB1* wśród 202 osób z chorobą wrzodową. Jedynie w parze *loci* 1236_2677 stwierdziłam istnienie niezrównoważenia o umiarkowanej sile ($D' = 0,187$), natomiast pary *loci* 1236_3435 i 2677_3435 okazały się pozostawać w niemal całkowitym zrównoważeniu ($D'_{1236-3435} = 0,036$, $D'_{1236-3435} = 0,051$). Uzyskany przez mnie wynik może dowodzić, że nielosowe współdziedziczenie może dotyczyć jedynie *loci* 1236 i 2677, natomiast *locus* 3435 dziedziczy się niezależnie do dwóch pozostałych badanych *loci*. Z tego względu wydaje się, że wykazany przeze mnie wcześniej związek polimorfizmu 3435 genu *ABCB1* z ryzykiem rozwoju choroby wrzodowej, jak i rozwojem zakażenia *H. pylori* w przebiegu tej choroby (**O 1**) nie jest jedynie wynikiem sprzężenia „niemego” polimorfizmu 3435C>T z innymi funkcjonalnymi *loci* *ABCB1*, ale efektem niezależnego wpływu *locus* 3435 na te ryzyka.

- O3** *Sałażacka A, Żebrowska M, Jeleń A, Mirowski M, Balcerczak E, 2014, Investigation of -308G>A and -1031T>C Polymorphisms of TNFA Promoter Region in Polish Peptic Ulcer Patients. Gut And Liver; 8: 632-6*
- O4** *Sałażacka-Kubiak A, Żebrowska M, Jeleń A, Mirowski M, Balcerczak E, 2016 (available online 18 December 2015), Assessment of TNFA polymorphisms at positions -857 and -863 in Polish peptic ulcer patients, Advances in Medical Sciences, 61*

W następnym etapie badań poszukiwałam zależności między wybranymi polimorfizmami pojedynczego nukleotydu promotora genu *TNFA*, kodującego jedną z głównych cytokin procesu zapalnego TNF- α : -308G>A (rs1800629), -857C>T (rs1799724), -863C>A (rs1800630), -1031T>C (rs1799964) a ryzykiem rozwoju choroby wrzodowej, oraz związku między wspomnianymi polimorfizmami a rozwojem zakażenia *Helicobacter pylori* u osób z chorobą wrzodową.

Dokonałam oceny polimorfizmów -308G>A i -1031T>C u 177 pacjentów z chorobą wrzodową, zarówno zakażonych, jak i niezakażonych *H. pylori* (**O3**), a następnie oceny mniej poznanych polimorfizmów -857C>T i -863C>T w 203 pacjentów

z chorobą wrzodową (O4). Polimorfizmy te nie były badane wcześniej w polskiej populacji osób z chorobą wrzodową. Tak, jak w przypadku polimorfizmu 3435C>T *ABCB1*, genotypowanie przeprowadzono posługując się techniką PCR-RFLP.

Uzyskane częstości genotypów dla wszystkich badanych polimorfizmów *TNFA* były zbliżone do częstości szacowanych na podstawie reguły Hardy'ego i Weinberga, co potwierdziło reprezentatywność wybranej grupy pacjentów dla badanej populacji. Częstości genotypów i alleli dla badanych polimorfizmów porównałam z częstościami uzyskanymi wcześniej przez *Bednarczuka i wsp., 2004* w polskiej populacji osób zdrowych. Nie wykazałam istotnych różnic w tych częstościach, co nie potwierdza, aby badane polimorfizmy *TNFA* były związane z ryzykiem rozwoju choroby wrzodowej w badanej populacji.

Aby stwierdzić istnienie związku między polimorfizmami *TNFA* a rozwojem zakażenia *H. pylori* u pacjentów z chorobą wrzodową dokonałam porównania częstości genotypów i alleli w podgrupach chorych zakażonych i niezakażonych tą bakterią. W przypadku żadnego z badanych wariantów polimorficznych nie stwierdziłam różnic w tych częstościach między osobami zakażonymi i niezakażonymi *H. pylori*.

O5 *Salagacka A, Zebrowska M, Jelen A, Mirowski M, Balcerczak E, 2014, Haplotype Analysis of TNFA Gene in Peptic Ulcer Patients, International Journal of Human Genetics, 14: 9-15*

Opublikowane wcześniej wyniki badań nad znaczeniem polimorfizmów promotora *TNFA* dają podstawę, by sądzić, że polimorfizmy te wywierają swój wpływ synergistycznie. Dlatego, aby możliwe było zaobserwowanie tego wpływu, powinny być one analizowane jednocześnie. Dla przykładu, *Chakravorty i wsp., 2008* nie stwierdzili związku między polimorfizmami (-308, -857, -863, -1031) *TNFA* a występowaniem choroby wrzodowej dwunastnicy na podłożu zakażenia *H. pylori*. Jednocześnie zaobserwowali istotnie wyższą częstość haplotypu G₋₃₀₈_C₋₈₅₇_A₋₈₆₃_T₋₁₀₃₁ w grupie badanych chorych niż u osób zakażonych *H. pylori* lecz nie wykazujących objawów choroby wrzodowej.

Z tego względu, na bazie uzyskanych wyników indywidualnego genotypowania czterech *loci TNFA*, dokonałam z pomocą programu PHASE 2.1 rekonstrukcji haplotypów tego genu u 203 pacjentów z chorobą wrzodową. W poddanej analizie grupie oszacowałam występowanie 13 różnych haplotypów *TNFA*. Pięć z nich, o częstości występowania powyżej 5% każdy, stanowiło łącznie 99% wszystkich oszacowanych haplotypów w badanej grupie. Najczęstszym haplotypem był T₋₁₀₃₁_C₋₈₆₃_C₋₈₅₇_G₋₃₀₈ (52,3%), cztery inne występowały z częstością kilku-kilkunastu procent. Częstość pozostałych nie była wyższa od 1%.

W celu oceny znaczenia struktury haplotypowej *TNFA* w rozwoju zakażenia *H. pylori* u osób z chorobą wrzodową, przeprowadziłam rekonstrukcję i oszacowanie częstości haplotypów *TNFA* w podgrupach pacjentów zakażonych i niezakażonych *H.*

pylori. Nie stwierdziłam istnienia istotnej statystycznej różnicy w częstości haplotypów *TNFA* między tymi podgrupami. Przeprowadziłam także analizę haplotypową w podgrupie chorych mężczyzn oraz w podgrupie chorych kobiet. Analogicznie do wyników analizy w całej grupie, tak i w podgrupach kobiet i mężczyzn nie stwierdziłam istotnej zależności między statusem zakażenia a częstością haplotypów. Badanie nie potwierdziło zatem, aby haplotypowa struktura *TNFA* była istotnym czynnikiem w rozwoju zakażenia *H. pylori* w przebiegu choroby wrzodowej.

Obok oszacowania częstości haplotypów *TNFA*, oceniłam także siłę sprzężenia między analizowanymi *loci* *TNFA*. Za pomocą programu EMLD oceniłam stopień niezrównoważenia sprzężeń między *loci* -308, -857, -863, -1031 genu *TNFA* wśród 203 osób z chorobą wrzodową. W parach *loci* -308_-857, -863_-1031 oraz -857_-1031 stwierdziłam istnienie niezrównoważenia o bardzo dużej sile (D' między 0,8901 a 0,9999), w parach -308_-1031 i -857_-863 niezrównoważenie o dużej sile (odpowiednio D' 0,4633 i 0,4940), a jedynie w parze -308_-863 o umiarkowanej sile (D' 0,1336). Uzyskany wynik potwierdza, że nielosowe współdziedziczenie dotyczy wszystkich badanych *locus* *TNFA*.

O6 Salagacka-Kubiak A, Żebrowska M, Wosiak A, Balcerczak M, Mirowski M, Balcerczak E, 2015, *ABCG2* in peptic ulcer: gene expression and mutation analysis. *Journal of Applied Genetics*, published on-line 17 November 2015

Rola genu *ABCG2* w rozwoju choroby wrzodowej nie była nigdy wcześniej oceniona, dlatego postawiłam sobie za cel zbadanie znaczenia polimorfizmu C421A genu *ABCG2*, jak również poziomu ekspresji tego genu w błonie śluzowej żołądka w rozwoju choroby wrzodowej i rozwoju zakażenia *Helicobacter pylori* u osób z chorobą wrzodową.

Posługując się techniką PCR-RFLP przeprowadzono ocenę polimorfizmu C421A u łącznie 201 pacjentów z chorobą wrzodową, zarówno zakażonych, jak i niezakażonych *H. pylori*, oraz u 97 osób zdrowych (bez choroby wrzodowej). Do badania poziomu ekspresji wyizolowano metodą kolumnkową całkowite RNA z biopłatów błony śluzowej żołądka osób z chorobą wrzodową. Stężenie i czystość uzyskanych preparatów RNA oceniono spektrofotometrycznie. Matrycowe RNA zawarte w wyizolowanych próbach całkowitego RNA było następnie przepisywane na komplementarne DNA (cDNA). Aby ocenić jakość uzyskanego cDNA, wykonywano jakościową reakcję PCR dla genu metabolizmu podstawowego *GAPDH* (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego). Próby, w których uzyskiwano produkt dla *GAPDH*, podlegały dalszej analizie za pomocą techniki PCR z detekcją przyrostu produktu w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*). W reakcji tej powielano w trzech powtórzeniach dla każdej próby fragmenty matrycy dla genów *ABCG2* i *GAPDH* (gen referencyjny) w obecności barwnika niespecyficznego SYBR Green. Zarówno dla genu badanego, jak i referencyjnego wykonano krzywą standardową, poprzez przeprowadzenie reakcji *real-time PCR* dla szeregu rozcieńczeń ampikonów dla *ABCG2* i *GAPDH*. Na podstawie nachylenia uzyskiwanych krzywych standardowych określono wydajność reakcji *real-*

time PCR. Ze względu na różnice w wydajności obu reakcji do obliczenia relatywnych wartości ekspresji genu *ABCG2* (względem ekspresji genu *GAPDH*) wykorzystano metodę opracowaną przez Pfaffl, 2001. Jako kalibrator wykorzystano średnią wartość *Ct* dla genu badanego, jak i referencyjnego obliczoną na podstawie wartości *Ct* uzyskanych we wszystkich próbach badanych.

Reprezentatywność analizowanej grupy pacjentów dla populacji badanej potwierdzona została poprzez brak istotnych odstępstw w uzyskanych częstościach genotypów od częstości wynikających z prawa Hardy'ego-Weinberga. Zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej dominujący genotypem był CC, a genotyp AA zaobserwowano jedynie w grupie badanej. Nie stwierdziłam istotnej różnicy w częstościach genotypów i alleli między grupą badaną i kontrolną, co nie potwierdza udziału tego polimorfizmu w patogenezie choroby wrzodowej żołądka. Genotypy CA lub AA i allel A występowały nieznacznie częściej wśród osób niezainfekowanych *H. pylori* niż w grupie zakażonych tą bakterią, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie. Nie daje to podstaw do stwierdzenia istotności badanego polimorfizmu w rozwoju zakażenia *H. pylori* u osób z chorobą wrzodową.

Obecność ekspresji genu *ABCG2* stwierdziłam u 63,3% badanych osób z chorobą wrzodową. Wcześniejsze badania immunohistochemiczne nie potwierdziły obecności białka *ABCG2* w nabłonku błony śluzowej żołądka, a poziom ekspresji *ABCG2* (mierzony za pomocą jakościowej reakcji RT-PCR) był relatywnie niski (Maliepaard i wsp., 2001). Mierzona ekspresja *ABCG2* może pochodzić z naczyń krwionośnych zawartych w tkankach badanych, w których to ekspresja BCRP została potwierdzona (Diestra i wsp., 2002; Maliepaard i wsp., 2001). Relatywny poziom wykrytej ekspresji różnił się znacznie między badanymi chorymi.

Gen *ABCG2* posiada elementy odpowiedzi na progesteron i estrogeny, potwierdzono, że hormony te podwyższają poziom mRNA i kodowanego przez gen *ABCG2* białka BCRP (Ee i wsp., 2004; Mao, 2008). Nie stwierdziłam zależności między obecnością, ani poziomem ekspresji badanego genu a płcią osób badanych. Jest to zgodne z obserwacjami Gutmann i wsp., 2005, którzy nie stwierdzili różnic w poziomie ekspresji *ABCG2* w dwunastnicy, jelicie cienkim czy grubym między kobietami i mężczyznami. Istnieją sprzeczne doniesienia dotyczące zmienności poziomu ekspresji *ABCG2* wraz z wiekiem (Kawase i wsp., 2015; Prasard i wsp., 2013). W omawianym badaniu nie stwierdziłam zależności między obecnością, ani poziomem ekspresji badanego genu a wiekiem osób badanych.

Aby ocenić związek między ekspresją *ABCG2* a zakażeniem *H. pylori* u badanych osób z chorobą wrzodową, zbadałam związek między obecnością, jak i poziomem ekspresji *ABCG2* a obecnością zakażenia tą bakterią i intensywnością tego zakażenia (mierzono go półilościowo za pomocą intensywności zabarwienia podłoża wskaźnikowego z teście ureazowym). Nie stwierdziłam statystycznie istotnego związku między obecnością, ani poziomem ekspresji *ABCG2* a obecnością zakażenia *H. pylori*. Jednak wśród osób zakażonych obecna była zależność między intensywnością tego zakażenia a obecnością ekspresji *ABCG2*. Ekspresja była stwierdzana istotnie częściej u osób o średniej i wysokiej intensywności zakażenia niż

u osób, u których ta intensywność była niewielka. Również poziom ekspresji *ABCG2* był związany z intensywnością tego zakażenia: im zakażenie bardziej nasilone, tym stwierdzany poziom ekspresji *ABCG2* był wyższy. Uzyskany wynik sugeruje, że zakażenie *H. pylori* nasila ekspresję badanego genu. Potencjalnie za regulację ekspresji *ABCG2* w tym przypadku mogą być odpowiedzialne cytokiny produkowane w zakażonej błonie śluzowej. *Evseenko i wsp., 2007* wykazali, że podawanie $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{IL-1}\beta$ zmniejsza ekspresję *ABCG2* w żołądku, natomiast inne cytokiny (EGF , IGF-2) zwiększają ją. Poznanie dokładnego mechanizmu leżącego u podłoża tego zjawiska wymaga jednak dalszych badań.

Podsumowanie

Najważniejsze rezultaty i wnioski wynikające z przeprowadzonych badań wchodzących w skład osiągnięcia:

1. Istnieje tendencja do częstszego występowania genotypu 3435 TT oraz allela 3435 T genu *ABCB1* wśród osób z chorobą wrzodową względem osób zdrowych oraz związek między obecnością co najmniej jednego allela 3435 T a zwiększonym ryzykiem wystąpienia zakażenia *H. pylori* u osób z chorobą wrzodową. Potwierdza to udział polimorfizmu 3435C>T w rozwoju choroby wrzodowej, jak i w rozwoju zakażenia *H. pylori* u osób z tą chorobą.
2. Obecne są istotne różnice w częstościach haplotypów genu *ABCB1* między osobami z chorobą wrzodową i zdrowymi, oraz między osobami z chorobą wrzodową zakażonymi i niezakażonymi *H. pylori*, co potwierdza istotność struktury haplotypowej *ABCB1* dla rozwoju choroby wrzodowej, jak i zakażenia *H. pylori* u tych chorych.
3. W grupie badanych osób z chorobą wrzodową wszystkie cztery badane *loci* *TNFA*, jak również *loci* 1236 i 2677 genu *ABCB1* podlegają zjawisku sprzężenia genetycznego. Jednocześnie *locus* 3435 *ABCB1* nie jest sprzężone z dwoma pozostałymi badanymi *loci* *ABCB1*. Z tego względu związek polimorfizmu 3435 z ryzykiem rozwoju choroby wrzodowej, jak i rozwojem zakażenia *H. pylori* w przebiegu tej choroby nie jest jedynie wynikiem sprzężenia „niemego” polimorfizmu 3435C>T z innymi funkcjonalnymi *loci* *ABCB1*, ale efektem niezależnego wpływu *locus* 3435 na te ryzyka.
4. Wśród osób z chorobą wrzodową zakażonych *H. pylori* istnieje związek między intensywnością tego zakażenia a obecnością i poziomem ekspresji genu *ABCG2*. Ekspresja była stwierdzana istotnie częściej u osób o średniej i wysokiej intensywności zakażenia, a jej poziom był tym wyższy, im zakażenie bardziej nasilone. Sugeruje to możliwość stymulacji ekspresji badanego genu w błonie śluzowej żołądka pod wpływem zakażenia *H. pylori*.

Piśmiennictwo

Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA, McLeod HL. *MDR1* pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; 11:217–21

Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Seki N, et al. Association of tumor necrosis factor and human leukocyte antigen DRB1 alleles with Graves' ophthalmopathy. *Hum Immunol* 2004; 65:632-39

Canedo P, Durães C, Pereira F, Regalo G, Lunet N, Barros H, Carneiro F, Seruca R, Rocha J, Machado JC. Tumor necrosis factor alpha extended haplotypes and risk of gastric carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:2416-20

Chakravorty M, Datta De D, Choudhury A, Santra A, Roychoudhury S. Association of specific haplotype of TNFalpha with *Helicobacter pylori*-mediated duodenal ulcer in eastern Indian population. *J Genet* 2008; 87:299-304

Cusatis G, Gregorc V, Li J, Spreafico A, Ingersoll RG, Verweij J, Ludovini V, Villa E, Hidalgo M, Sparreboom A, Baker SD. Pharmacogenetics of ABCG2 and adverse reactions to gefitinib. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:1739-42

Diestra JE, Scheffer GL, Català I, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, Germà-Lluch JR, Izquierdo MA. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J Pathol* 2002; 198:213–9

Ding SZ, Lam SK, Yuen ST, Wong BC, Hui WM, Ho J, Guo X, Cho CH. Prostaglandin, tumor necrosis factor alpha and neutrophils: causative relationship in indomethacin-induced stomach injuries. *Eur J Pharmacol* 1998; 348:257-63

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:15665-70

Ee PL, Kamalakaran S, Tonetti D, He X, Ross DD, Beck WT. Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Res* 2004; 64:1247-51

Evseenko DA, Paxton JW, Keelan JA. Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors. *Drug Metab Dispos* 2007; 35:595–601

Falvo JV, Tsytsykova AV, Goldfeld AE. Transcriptional control of the TNF gene. *Curr Dir Autoimmun* 2010; 11: 27-60

Frederiks CN, Lam SW, Guchelaar HJ, Boven E. Genetic polymorphisms and paclitaxel- or docetaxel-induced toxicities: A systematic review. *Cancer Treat Rev* 2015; 41:935-50

Gawrońska-Szklarz B, Wrześniewska J, Starzyńska T, Pawlik A, Safranow K, Ferenc K, Drożdżik M. Effect of *CYP2C19* and *MDR1* polymorphisms on cure rate in patients with acid-related disorders with *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61:375-9

Goto H. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *Nagoya J Med Sci* 2003; 66: 77-85

Gutmann H, Hruz P, Zimmermann C, Beglinger C, Drewe J. Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochem Pharmacol* 2005; 70:695-9

Hishida A, Matsuo K, Goto Y, Hamajima N. Genetic predisposition to *Helicobacter pylori*-induced gastric precancerous conditions. *World J Gastrointest Oncol* 2010, 2:369-79

Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. 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: 293-8

Imai Y, Nakane M, Kage K, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Miki Y, Sugimoto Y. C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 611-6

Jamroziak K, Młynarski W, Balcerczak E, Mistygacz M, Trelinska J, Mirowski M, Bodalski J, Robak T. Functional C3435T polymorphism of *MDR1* gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol* 2004; 72:314-21

Jamroziak K, Balcerczak E, Calka K, Piaskowski S, Urbanska-Rys H, Salagacka A, Mirowski M, Robak T. Polymorphisms and haplotypes in the multidrug resistance 1 gene (*MDR1/ABCB1*) and risk of multiple myeloma. *Leuk Res* 2009; 33:332-5
Januszewicz W, Kokot F. *Interna*. T. I. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2004, s. 451-65

Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci* 2000; 25:1-6

Kawase A, Ito A, Yamada A, Iwaki M. Age-related changes in mRNA levels of hepatic transporters, cytochrome P450 and UDPglucuronosyltransferase in female rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2015; 40:239-44

- Kim N, Cho SI, Yim JY, Kim JM, Lee DH, Park JH, Kim JS, Jung HC, Song IS. The effects of genetic polymorphisms of IL-1 and TNF- α on *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases in Korea. *Helicobacter* 2006; 11:105-12
- Kondo C, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Kobayashi D, Ieiri I, Mine K, Ohtsubo K, Sugiyama Y. Functional analysis of SNPs variants of *BCRP/ABCG2*. *Pharm Res* 2004; 21:1895-1903
- Lee SG, Kim B, Yook JH, Oh ST, Lee I, Song K. *TNF/LTA* polymorphisms and risk for gastric cancer/duodenal ulcer in the Korean population. *Cytokine* 2004; 28:75-82
- Liu Z, Liu K. The transporters of intestinal tract and techniques applied to evaluate interactions between drugs and transporters. *Asian J Pharm Sci* 2013; 8:151-8
- Malfertheiner P, Chan FK, McColl KE. Peptic ulcer disease. *Lancet* 2009; 374: 1449-61
- Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 2001; 61:3458-64
- Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H. Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced ATPase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer* 2004; 109:238-46
- Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J* 2005; 7:E118-33
- Mao Q. BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation. *Pharm Res* 2008; 25:1244-55
- Mizutani T, Masuda M, Nakai E, Furumiya K, Togawa H, Nakamura Y, Kawai Y, Nakahira K, Shinkai S, Takahashi K. Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1). *Curr Drug Metab* 200; 9: 167-74
- Mo W, Zhang JT. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol* 2012; 3:1-27
- Osswald E, Johne A, Laschinski G, Arjomand-Nahad F, Malzahn U, Kirchheiner J, Gerloff T, Meisel C, Mrozikiewicz PM, Chernov J, Roots I, Köpke K. Association of *MDR1* genotypes with susceptibility to colorectal cancer in older non-smokers. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63:9-16
- Räihä I, Kempainen H, Kaprio J, Koskenvuo M, Sourander L. Lifestyle, stress, and genes in peptic ulcer disease: a nationwide twin cohort study. *Arch Intern Med* 1998; 158:698-704

Panczyk M, Balcerczak E, Piaskowski S, Jamroziak K, Pasz-Walczak G, Mirowski M. *ABCB1* gene polymorphisms and haplotype analysis in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24:895-905

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:e45

Prasad B, Lai Y, Lin Y, Unadkat JD. Interindividual variability in the hepatic expression of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): effect of age, sex, and genotype. *J Pharm Sci* 2013; 102:787-93

Randolph GJ, Beaulieu S, Pope M, Sugawara I, Hoffman L, Steinman RM, Muller WA. A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6924–9

Schabowski J. Selected socio-economic features and the prevalence of peptic ulcer among Polish rural population. *Ann Agric Environ Med* 2002; 9:79-84

Siegsmond M, Brinkmann U, Schäffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M, Fritz P, Burk O, Decker J, Alken P, Rothenpieler U, Kerb R, Hoffmeyer S, Brauch H. Association of the P-glycoprotein transporter MDR1 (C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:1847-54

Sugimoto M, Furuta T, Shirai N, Kodaira C, Nishino M, Yamade M, Ikuma M, Watanabe H, Ohashi K, Hishida A, Ishizaki T. Treatment strategy to eradicate *Helicobacter pylori* infection: impact of pharmacogenomics-based acid inhibition regimen and alternative antibiotics. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8:2701-17

Sugimoto M, Yamaoka Y, Furuta T. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. *World J Gastroenterol* 2010, 16:1188-1200

Szakács G, Váradi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 2008; 13:379-93

Szczeklik A. Choroby wewnętrzne. T. I. Kraków: Medycyna Praktyczna, 2005, s. 779-85

Tanabe M, Ieri I, Nagata N: Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (*MDR1*) gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297:1137-43

Thorsen K, Søreide JA, Kvaløy JT, Glomsaker T, Søreide K. Epidemiology of perforated peptic ulcer: age- and gender-adjusted analysis of incidence and mortality. *World J Gastroenterol* 2013; 19:347-54

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

Wilschanski M, Schlesinger Y, Faber J, et al. Combination of *Helicobacter pylori* strain and tumor necrosis factor-alpha polymorphism of the host increases the risk of peptic ulcer disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45:199-203

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Działalność naukowa

W 2005 roku ukończyłam z wynikiem bardzo dobrym i wyróżnieniem studia na kierunku Analityka Medyczna na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i podjęłam studia doktoranckie w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej (obecnie Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Międzywydziałowej Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej) Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi. Od tego czasu pracuję w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki (wcześniej Pracownia Biologii Molekularnej i Farmakogenomiki) kierowanej przez dr hab. prof. nadzw. Ewę Balcerczak. W roku 2008 zostałam zatrudniona w Zakładzie na stanowisku asystenta, a w 2009 roku uzyskałam stopień doktora nauk farmaceutycznych. Tematem mojej rozprawy doktorskiej był „Ekspresja genu *ABCG2* i białka oporności raka piersi (BCRP) jako potencjalnych czynników prognostycznych w raku jelita grubego” (promotor: prof. dr hab. Marek Mirowski). Od 2011 roku jestem zatrudniona w Zakładzie na stanowisku adiunkta.

Sumaryczny *impact factor* moich wszystkich publikacji wynosi 26,141 (391 punktów MNiSW) a liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection: 73.

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych wyniki mojej pracy naukowej były opublikowane w formie 1 publikacji oryginalnej i 2 publikacjach przeglądowych (IF=2,358; MNiSW: 31), a także przedstawione na 4 konferencjach naukowych, w tym 2 zagranicznych.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych mój dorobek naukowy obejmuje 21 prac oryginalnych oraz 5 publikacji przeglądowych (IF=23,783; MNiSW: 360). Ponadto wyniki mojej pracy były prezentowane na 15 konferencjach naukowych, w tym 8 zagranicznych, zarówno w formie doniesień plakatowych, jak i ustnych.

W mojej pracy naukowej, poza badaniami przedstawionymi w ramach rozprawy habilitacyjnej, współuczestniczyłam także w badaniach dotyczących:

- A. poszukiwania nowych molekularnych czynników ryzyka rozwoju chorób nowotworowych i związanych z ich przebiegiem czynników, prognostycznych i predykcyjnych
- B. poszukiwania nowych molekularnych czynników ryzyka rozwoju chorób nienowotworowych i związanych z ich przebiegiem czynników, prognostycznych i predykcyjnych

- C. znaczenia genu *FJ194940.1* i kodowanego przez nie białka ACJ04040.1 w nowotworach złośliwych
- D. wpływu rodzaju leczenia przewlekłej białaczki limfatycznej na ekspresję genów związanych z apoptozą
- E. innych zagadnień

A. Poszukiwanie nowych molekularnych czynników ryzyka rozwoju chorób nowotworowych i związanych z ich przebiegiem czynników prognostycznych i predykcyjnych

Rak jelita grubego

W pracy doktorskiej podjęłam się oceny wartości prognostycznej ekspresji genu *ABCG2* i kodowanego przez nie białka BCRP w rakach jelita grubego. Badanie to przeprowadzono we współpracy z Zakładem Patologii Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W badanej grupie przypadków raka jelita grubego nie stwierdzono zależności między poziomami ekspresji *ABCG2* i ilości BCRP a czynnikami kliniczno-patologicznymi, uznanymi w prognozowaniu tego nowotworu. Mimo to, zaobserwowano tendencję do dłuższego czasu przeżycia chorych, u których wykryto nawet niewielkie ilości białka BCRP lub wysoką ekspresję *ABCG2*, co może sugerować istnienie niezależnego od znanych czynników mechanizmu, w którym badany transporter wpływa na progresję nowotworu.

W innym badaniu dotyczącym raka jelita grubego (**JCR 3**) oceniono za pomocą techniki immunohistochemicznej ekspresję NM-23 i maspiny, białek o charakterze supresorów nowotworowych. Badanie wykazało, że pośrednia lub wysoka ekspresja maspiny i NM-23 jest związana z obecnością wybranych niekorzystnych czynników prognostycznych jak typ histologiczny nowotworu, niskie zróżnicowanie histologiczne komórek nowotworowych, głębsze naciekanie ściany jelita przez nowotwór, obecność przerzutów w węzłach chłonnych oraz przerzutów odległych, wyższy stopień zaawansowania nowotworu i zajęcie naczyń przez nowotwór. Wykazano również, że średnia lub wysoka ekspresja maspiny jest niezależnym czynnikiem prognostycznym związanym z krótszym całkowitym czasem przeżycia chorych.

W tej samej grupie przypadków raka jelita grubego zbadano niezależnie trzy polimorfizmy genu *ABCB1* (1236C>T, 2677G>T/A, 3435C>T) oraz przeprowadzono na tej podstawie rekonstrukcję haplotypów *ABCB1* (**JCR 2**). Allel 3435 T współwystępował z mniejszym zaawansowaniem klinicznym nowotworu, mniejszym naciekaniem ściany jelita i brakiem przerzutów odległych. W badaniu wieloparametrowym stwierdzono, że jest on niezależnym pozytywnym czynnikiem prognostycznym i wiąże się z niższym ryzykiem zgonu u badanych pacjentów. Wykazano również różną częstość poszczególnych haplotypów *ABCB1* u chorych posiadających lub nie przerzuty odległe. Haplotyp T₁₂₃₆_G₂₆₇₇_C₃₄₃₅ był obecny wyłącznie w podgrupie pacjentów o mniejszym stopniu zaawansowania choroby, bez

przerzutów odległych, i tak jak allel 3435 T, jest potencjalnym pozytywnym czynnikiem prognostycznym w tym typie nowotworu.

Rak żołądka

Wspomniane wcześniej trzy polimorfizmy *ABCB1* zbadano także w kontekście ich znaczenia dla rozwoju i progresji raka żołądka (**JCR 10**). Nie stwierdzono różnic w częstościach poszczególnych genotypów i alleli dla badanych polimorfizmów między badanymi chorymi a osobami zdrowymi, co nie potwierdza znaczenia tych polimorfizmów dla ryzyka rozwoju badanego nowotworu. Jednocześnie zaobserwowano tendencję do częstszego występowania genotypu TT dla wszystkich badanych polimorfizmów w przypadkach o niższym stopniu zaawansowania nowotworu. Dodatkowo, w pilotażowym badaniu na niewielkiej podgrupie chorych stwierdzono, że ekspresja *ABCB1* w tkance nowotworowej jest niższa w przypadkach mniej zaawansowanych klinicznie. Uzyskane wyniki wskazują, że gen *ABCB1* może być istotny dla progresji raka żołądka.

W badaniu wstępnym (**I 9**) oceniono związek między występowaniem wariantów dla polimorfizmu C421A genu *ACBG2* a ryzykiem rozwoju raka żołądka. Zarówno w grupie badanej, jak i grupie osób zdrowych wykazano obecność jedynie osób o genotypie CC, z tego względu nie możliwa była ocena wspomnianej zależności. Badania są kontynuowane na liczniejszej grupie chorych.

Szpiczak mnogi

Znaczenie polimorfizmu sekwencji *ABCB1* zbadane zostało także w szpiczaku mnogim (MM) (**JCR 1**). W badaniu przeprowadzonym we współpracy z Kliniką Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, nie stwierdzono istotnych różnic w częstościach genotypów, jak i alleli dla polimorfizmów w pozycjach 1236, 2677, 3435 w grupie osób z MM i kontrolnej grupie osób zdrowych. Grupy te nie różniły się również częstością haplotypów *ABCB1*, którą oszacowano matematycznie na podstawie wyników indywidualnego genotypowania *ABCB1* we wspomnianych pozycjach. Badanie nie potwierdziło zatem znaczenia polimorficznej struktury tego genu w tworzeniu predyspozycji do rozwoju szpiczaka mnogiego.

W innym badaniu nad znaczeniem zmian genetycznych w rozwoju i przebiegu szpiczaka mnogiego (**I 6**) przeprowadzono analizę polimorfizmów N363S i *BclI* genu *NR3C1*, kodującego receptor glukokortykoidowy. Jest on komórkowym celem dla deksametazonu, jednego z komponentów schematu VAD, stosowanego w leczeniu szpiczaka mnogiego. Wykazano, że allel *BclI* G oraz allel N363S A są istotnie związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju MM. Jednocześnie nie stwierdzono istnienia zależności między występowaniem poszczególnych alleli lub genotypów dla badanych polimorfizmów a uznanymi czynnikami prognostycznymi w MM jak stężenie kreatyniny, CRP, albuminy, hemoglobiny, stopień zaawansowania choroby wg klasyfikacji WHO i Durie-Salmon. Analiza przeżycia nie wykazała różnic w całkowitym czasie przeżycia między grupami chorych leczonych schematem VAD o różnym genotypie *BclI*, stąd badanie nie potwierdziło wpływu badanego polimorfizmu na wyniki terapii tym schematem.

B. Poszukiwania nowych molekularnych czynników ryzyka rozwoju chorób nienowotworowych i związanych z ich przebiegiem czynników, prognostycznych i predykcyjnych

Choroba wrzodowa

Poza badaniami nad znaczeniem czynników molekularnych w rozwoju choroby wrzodowej, przedstawionymi w publikacjach zgłaszanych jako osiągnięcie naukowe, współuczestniczyłam również w innych badaniach dotyczących tej tematyki prowadzonych we współpracy ze Szpitalem Powiatowym w Łęczycy. W grupie osób z chorobą wrzodową i w grupie kontrolnej osób zdrowych przeprowadzono genotypowanie *ABCB1* w pozycjach 1236 i 2677 (**JCR 7**). Nie stwierdzono istotnych różnic w częstościach genotypów i alleli dla badanych polimorfizmów między grupami badaną i kontrolną, zaobserwowano jednak tendencję do częstszego występowania genotypu TT i allele T dla tych polimorfizmów w grupie badanej, co sugeruje ich związek ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby wrzodowej. Zależność między występowaniem zakażenia *H. pylori* a częstością genotypów stwierdzono jedynie dla polimorfizmu 1236 w podgrupie chorych kobiet.

Badanie polimorficznej struktury *ABCB1* w chorobie wrzodowej poszerzono o badanie ekspresji tego genu (**JCR 9**). Względny poziom ekspresji zbadano z pomocą techniki real-time PCR w próbach RNA wyizolowanego z bioptatów błony śluzowej żołądka. Badanie wykazało, że poziom ekspresji *ABCB1* nie jest związany z obecnością zakażenia *H. pylori* u osób z chorobą wrzodową, ani z nasileniem tego zakażenia u chorych zainfekowanych. Nie różnił się on także między kobietami i mężczyznami, był jednak związany z wiekiem - istotnie wyższy poziom ekspresji zanotowano u pacjentów starszych.

Depresja

Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej prowadzi współpracę z Kliniką Psychiatrii Dorosłych UMED w Łodzi, czego efektem jest mój udział w badaniu znaczenia polimorfizmów *ABCB1* dla rozwoju, przebiegu i wyników leczenia zaburzeń depresyjnych nawracających (rDD). Badania przeprowadzone na grupie osób z tym schorzeniem i grupie osób zdrowych (**JCR 12**) wykazały, że genotyp 3435 TT związany jest z zwiększonym ryzykiem rozwoju rDD. Natomiast wśród badanych chorych osoby o genotypie CC wykazywały istotnie większe nasilenie objawów choroby, ale jednocześnie – lepsze wyniki leczenia farmakologicznego.

Wstępna ocena polimorfizmu 1236 (**I 8**) u niewielkiej części chorych z rDD ze wspomnianego wcześniej badania nie wykazała istnienia związku między obecnością tego wariantu genetycznego a ryzykiem rozwoju badanego schorzenia, nasileniem objawów czy skutecznością terapii przeciwdepresyjnej. Badanie rozszerzono następnie na większą grupę chorych oraz wzbogacono o badanie polimorfizmu 2677G>A/T i analizę haplotypową obejmującą *loci* 1236, 2677 i 3435 (*praca w recenzji*). Różnice w częstościach poszczególnych genotypów między badanymi grupami wykazano dla polimorfizmu 1236, ale nie dla polimorfizmu 2677. Grupy te

różniły się także częstością oszacowanych haplotypów *ABCB1*. Genotyp 2677 GG wiązał się z występowaniem bardziej nasilonych objawów choroby. Jednocześnie u osób z genotypem 2677 GG lub 1236 CC uzyskiwano lepsze efekty terapii przeciwdepresyjnej.

C. Znaczenie genu *FJ194940.1* i kodowanego przez nie białka ACJ04040.1 w nowotworach złośliwych

W Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej prowadzone są prace badawcze nad genem *FJ194940.1* i kodowanym przez nie białkiem ACJ04040.1 (wcześniej P65). Wykazano jego przydatność jako nowego markera molekularnego w monitorowaniu chorób nowotworowych, a w szczególności w raku jelita grubego. Ustalono chromosomową lokalizację genu i jego homologię do ludzkiego retrowirusa z rodziny HERV166. Przebieg prac badawczych opisano szczegółowo w **Opr 1**. Współuczestniczyłam w ocenie ekspresji eksonu V genu *FJ194940.1*, która wykazała, że istnieje tendencja do niższego poziomu tej ekspresji u chorych, u których stwierdzono zajęcie naczyń przez nowotwór. Jednocześnie ryzyko zgonu pacjentów o niskim poziomie ekspresji egzonu V było niemal dwukrotnie wyższe w porównaniu z pacjentami o wysokiej ekspresji (**JCR 8**). Badany poziom ekspresji był związany z progresją nowotworu niezależnie od innych uznanych czynników prognostycznych.

Budowę egzonowo-intronową genu *FJ194940.1* przewidywaną na podstawie analiz bioinformatycznych analizowano w kilku typach nowotworów (m.in. rak piersi, tarczycy, ostre i przewlekłe białaczki). Było to możliwe dzięki zastosowaniu zestawu starterów do PCR pozwalających na powielanie fragmentów poszczególnych przewidywanych egzonów i połączeń egzonowo-intronowych. Wstępne badania wykazały, że gen *FJ194940.1* podlega procesowi alternatywnego składania. Współuczestniczyłam w badaniach, które potwierdziły występowanie tego zjawiska w raku jelita grubego (**JCR 4**). Oceniono również użyteczności kliniczną oceny splice wariantów *FJ194940.1*. Obecność ekspresji egzonów IV i V i połączeń między egzonami III/IV i IV/V była związana z wysokim lub pośrednim zróżnicowaniem komórek nowotworowych (grading I lub II), a obecność ekspresji egzonów II i III oraz połączeń I/II i II/III – z obecnością nacieku limfocytarnego, ale i krótszym całkowitym czasem przeżycia chorych.

D. Wpływ rodzaju leczenia przewlekłej białaczki limfatycznej na ekspresję genów związanych z apoptozą

Wyrazem moich zainteresowań badawczych farmakogenomiką był współudział w badaniach prowadzonych we współpracy z Kliniką Hematologii UMED w Łodzi. Dotyczyły zmian ekspresji wielu genów pod wpływem zastosowania różnych rodzajów farmakoterapii w komórkach jednojądrzastych pobranych od chorych z przewlekłą białaczką limfatyczną (CLL). W patogenezie tego typu białaczki istotną rolę odgrywa

zahamowanie procesu apoptozy w komórkach limfocytów, a stosowane obecnie schematy leczenia mają za zadanie uaktywnić ten proces. Do badania wybrano 93 geny związane z procesem apoptozy, a badanie ich relatywnego poziomu ekspresji przeprowadzono za pomocą tzw. macierzy niskiej gęstości (ang. *low density arrays*). Porównanie poziomu ekspresji badanych genów w komórkach traktowanych *ex vivo* fludarabiną i komórkach poddawanych działaniu kladrybiny (**JCR 6**) wyłoniło grupę 27 genów o zróżnicowanej ekspresji. Największe różnice zanotowano dla genów *BAD*, *TNFRSF21*, *DAPK1*, *CARD6*, *CARD9*. Uzyskany wynik sugeruje, że fludarabina i kladrybina mogą wzmacniać proces apoptozy poprzez inne ścieżki sygnałowe.

Badania kontynuowano, porównując profil ekspresji tych samych 93 genów w komórkach poddawanych działaniu rituksimabu, kladrybiny i cyklofosfamidu (RCC), szeroko stosowanego schematu leczenia chorych z CLL, uwzględniając status mutacji *IGHV* (**JCR 5**). Wyniki badania zdeponowano w bazie Gene Expression Omnibus (nr dostępu GSE33925). Przed zastosowaniem wymienionych wcześniej leków wzór ekspresji badanych genów w dużej mierze był związany ze statusem mutacji *IGHV*. W podgrupie chorych ze zmutowanym genem *IGHV* pod wpływem zastosowanego leczenia wzrastała ekspresja wielu genów o charakterze proapoptotycznym. Badanie potwierdziło, że schemat RCC może wywierać swoje działanie przez modyfikację ekspresji genów związanych z apoptozą, ale zależnie do statusu mutacji *IGHV*.

E. Inne zagadnienia

We współpracy z NZOZ „Pulsmed” w Łodzi zbadano wpływ terapii chelatowej na wyniki badań wybranych parametrów laboratoryjnych u osób z umiarkowaną hipercholesterolemią i hiperglikemią (**I 7**). Terapia chelatowa była u tych osób sposobem wspomagania leczenia podstawowego. Wykazano, że podczas terapii chelatowej istotnie zmieniały się wartości stężenia glukozy, cholesterolu całkowitego, LDL oraz OB. Z uzyskanych wyników można wnioskować, że terapia chelatowa ma korzystny wpływ na badane parametry laboratoryjne i może wspomagać leczenie statynami.

Inne badanie przeprowadzone we współpracy z „Pulsmed” dotyczyło pacjentów z otyłością, a celem pracy było poszukiwanie zależności między wskaźnikami antropometrycznymi, parametrami lipidogramu, stężeniami glukozy, leptyny i greliny u osób przed i po implantacji balonu żołądkowego typu BIB (ORBERA). Wykazano istotną zmianę wartości wszystkich mierzonych parametrów po implantacji balonu żołądkowego (spadek wartości: BMI, WHR, % tkanki tłuszczowej, ELW/WL, stężenia glukozy, cholesterolu, triglicerydów, cholesterolu frakcji LDL i leptyny; wzrost wartości: stężenia cholesterolu frakcji HDL i greliny). Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że zabieg implantacji balonu żołądkowego typu BIB (ORBERA) wpływa korzystnie na badane parametry laboratoryjne i antropometryczne. Publikacja dokumentująca to badanie (**I 10**) nie została ujęta w analizie bibliometrycznej.

Patrycja Kubiś