

Magdalena Król

Receptory estrogenowe i markery stresu oksydacyjnego u kobiet z rakiem piersi.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Praca wykonana

w Zakładzie Monitoringu Biologicznego i Środowiska
Instytutu Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi
pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Gromadzińskiej

STRESZCZENIE

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym wśród kobiet w Polsce i na świecie. Zachorowalność na ten typ nowotworu wzrosła dwukrotnie, w naszym kraju, w ciągu ostatnich trzech dekad i stanowi 22% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów. Ilość zgonów powodowana tym typem nowotworu systematycznie spada od początku lat 90. ubiegłego wieku i obecnie stanowi ok 13% wszystkich zgonów powodowanych chorobą nowotworową u kobiet.

Głównymi czynnikami ryzyka zachorowania na ten typ nowotworu są wiek, otyłość, długość ekspozycji na estrogeny (np. stosowanie hormonalnej terapii zastępczej, wczesna pierwsza miesiączka i późne wejście w okres menopauzy), bezdzietność oraz spożywanie alkoholu.

Ze względu na szczególną rolę estrogenów w etiologii raka piersi nowotwór ten zaliczany jest do grupy nowotworów estrogenozależnych. Estron i 17- β -estradiol na skutek wiązania z receptorami estrogenowymi alfa (ER α kodowany przez ERS1) i beta (ER β kodowany przez ESR2) inicjują aktywację tych receptorów. W badaniach prowadzonych na liniach komórkowych raka piersi wykazano, że receptory te pełnią antagonistyczne role na etapie inicjacji procesu nowotworowego. ER α odpowiada za proliferację i wzrost komórek nowotworowych, natomiast ER β promuje apoptozę i hamuje ich wzrost.

Rola czynników transkrypcyjnych jaką pełnią ER α i ER β w komórce możliwa jest dzięki specyficznej budowie domeny wiążącej DNA. Aktywowane ligandem receptory ulegają dimeryzacji, a następnie za pomocą palców cynkowych wiążą się z DNA w miejscu ERE (ang. estrogen response element) inicjując tym samym proces transkrypcji genów wybranych białek.

Struktura palców cynkowych jest szczególnie wrażliwa na działanie reaktywnych form tlenu (RFT), które utleniając jony cynku niszczą trzyczłonową strukturę białka. W celu zapobiegania temu niekorzystnemu zjawisku w kompleks białkowy otaczający ER α włączone są enzymy antyoksydacyjne takie jak cynkowo-miedziowa dysmutaza ponadtlenkowa (Zn/Cu-SOD, kodowana przez gen SOD1) oraz reduktaza tioredoksyny (TrxR).

Zn/Cu-SOD katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenu do nadtlenu wodoru, natomiast TrxR wraz z tioredoksyną utrzymuje redukcyjne środowisko w komórce. Innym istotnym enzymem antyoksydacyjnym, nie wchodzącym w strukturę kompleksu jest cytozolowa peroksydaza glutationowa (GPx-1 kodowana przez gen GPX1), która przekształca nadtlenek wodoru i nadtlenuki organiczne odpowiednio do wody i alkoholi, równocześnie utleniając zredukowany glutation.

Zaburzenie równowagi pomiędzy ilością generowanych RFT, a aktywnością enzymów antyoksydacyjnych powoduje powstawanie stresu oksydacyjnego. Zjawisko to jest powszechnie wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej. Podawanie leków zwiększających stężenie RFT w komórkach nowotworowych prowadzi do licznych uszkodzeń struktur komórkowych, co indukuje proces apoptozy.

Obecność receptorów estrogenowych jak i aktywność enzymów antyoksydacyjnych jest istotna na etapie indukcji, rozwoju oraz w procesie leczenia nowotworu piersi. Profil ekspresji genów tych białek w różnym materiale biologicznym może mieć istotne znaczenia w ocenie przebiegu choroby i skuteczności procesu leczenia.

Nie bez znaczenia wydaje się również występujący wariant genetyczny *ESR1*. W licznych badaniach wykazano, że polimorfizmy pojedynczych nukleotydów występujące w genie tego receptora mogą wpływać na zwiększenie lub zmniejszenie ryzyka wystąpienia raka piersi.

Głównym celem rozprawy było określenie związku pomiędzy receptorami estrogenowymi alfa i beta a markerami stresu oksydacyjnego u kobiet z rakiem piersi, z uwzględnieniem dodatkowych czynników takich jak polimorfizm genetyczny receptora estrogenowego alfa i obraz kliniczny choroby. Cel ten został zrealizowany poprzez ocenę profilu ekspresji genów *ESR1*, *ESR2*, *SOD1* i *GPX1* w tkance guza i tkance prawidłowej pobranej śródoperacyjnie od pacjentek z rakiem piersi oraz w leukocytach krwi obwodowej kobiet z rakiem piersi i kobiet zdrowych, a także określeniem wzajemnych zależności pomiędzy ekspresją genów *ESR1* i *ESR2* a *GPX1* i *SOD1* w badanym materiale biologicznym. Ponadto określono związek pomiędzy genotypem ER α a ryzykiem zachorowania na raka piersi oraz jego wpływ na markery stresu oksydacyjnego w grupie kobiet z rakiem piersi i grupie kontrolnej.

Profil ekspresji genów oznaczono techniką Real-Time PCR z wykorzystaniem tkanki guza i otaczającej go tkanki prawidłowej pobranej od 37 pacjentek oraz leukocytów krwi obwodowej pobranych od 67 kobiet rakiem piersi oraz 71 kobiet zdrowych. Polimorfizm genetyczny *ESR1* został oznaczony z wykorzystaniem sond TaqMan w leukocytach krwi obwodowej 223 kobiet z rakiem piersi i 209 kobiet zdrowych. Ponadto u wszystkich kobiet oznaczono stężenie TBARS w osoczu i aktywność GPx-1 i Zn/Cu-SOD w erytrocytach.

Wykazano znamienne statystycznie niższą ekspresję genu *ESR1* i *GPX1* w tkance guza w porównaniu do tkanki prawidłowej. W przypadku ekspresji genu *ESR1* różnica ta wynosiła 12,8%, natomiast dla genu *GPX1* 6,9% (NRQ(*ESR1*) = 0,872; NRQ(*GPX1*)=0,971; p<0,05). Obniżeniem

ekspresji genu *ESR1* charakteryzowały się wszystkie guzy bez względu na typ histopatologiczny (typ przewodowy: $\text{NRQ}(\text{ESR1})=0,921$; typ inny niż przewodowy: $\text{NRQ}(\text{ESR1})=0,861$; $p<0,05$), guzy o większej niż 2 cm średnicy (T2) ($\text{NRQ}(\text{ESR1})=0,907$; $p<0,05$), o dodatnim statusie receptora estrogenowego (ER+) ($\text{NRQ}(\text{ESR1})=0,934$; $p<0,05$), o ujemnym statusie receptora progesteronowego (PR-) ($\text{NRQ}(\text{ESR1})=0,793$; $p<0,05$), guzy z prawidłową ekspresją receptora HER2 (HER2-) ($\text{NRQ}(\text{ESR1})=0,875$; $p<0,05$) oraz guzy pacjentek u których nie stwierdzono przerzutów do węzłów chłonnych (N0) ($\text{NRQ}(\text{ESR1})=0,890$; $p<0,05$). Podobnie jak w przypadku genu *ESR1* obniżenie ekspresji genu *GPXI* dotyczyło tkanek guza bez względu na typ histopatologiczny nowotworu (typ przewodowy: $\text{NRQ}(\text{GPXI})=0,947$; typ inny niż przewodowy: $\text{NRQ}(\text{GPXI})=0,860$; $p<0,05$) oraz guzów o średnicy większej niż 2 cm ($\text{NRQ}(\text{GPXI})=0,895$; $p<0,05$). Ponadto ekspresja genu *GPXI* była znacząco niższa w guzie bez względu na status receptorów hormonalnych (ER+: $\text{NRQ}(\text{GPXI})=0,897$; ER-: $\text{NRQ}(\text{GPXI})=0,889$; PR+: $\text{NRQ}(\text{GPXI})=0,893$; PR-: $\text{NRQ}(\text{GPXI})=0,901$; $p<0,05$). Obniżenie to dotyczyło również guzów o prawidłowej ekspresji receptora HER2 ($\text{NRQ}(\text{GPXI})=0,901$; $p<0,05$), oraz pacjentek u których nie występowały przerzuty do węzłów chłonnych ($\text{NRQ}(\text{GPXI})=0,875$; $p<0,05$).

Zaobserwowano również istotną statystycznie korelację pomiędzy ekspresjami genów *ESR1* i *GPXI* w tkance guza jak i tkance prawidłowej ($R_s=0,360$ oraz $R_s=0,450$; $p<0,05$) oraz ujemną zależność pomiędzy wartościami ekspresji genów *ESR1* i *SOD1* w obu badanych tkankach (guz: $R_s=-0,389$; prawidłowa: $R_s=-0,362$; $p<0,05$). Dodatnia korelacja charakteryzowała również ekspresję genów *GPXI* i *SOD1* w tkance guza ($R_s=0,436$; $p<0,05$).

Na podstawie uzyskanych wyników ekspresji genów *ESR1*, *ESR2*, *SOD1* i *GPXI* w leukocytach krwi obwodowej kobiet z rakiem piersi i kobiet zdrowych zaobserwowano, że pacjentki z rakiem piersi charakteryzowały się obniżoną ekspresją genu *ESR1* oraz podwyższoną ekspresją genów *SOD1* i *ESR2* w porównaniu do grupy kontrolnej. Ekspresja genu *ESR1* była niższa w grupie kobiet chorych o 9,3% ($\text{NRQ}(\text{ESR1})=0,907$; $p<0,05$), natomiast ekspresja genu *ESR2* była podwyższona o 28,5% ($\text{NRQ}(\text{ESR2})=1,285$; $p<0,05$), a genu *SOD1* o 2,5% ($\text{NRQ}(\text{SOD1})=1,025$; $p<0,05$), w porównaniu do ekspresji tych genów w leukocytach kobiet zdrowych.

Dla obu badanych grup wykazano pozytywną, znaczącą korelację liniową pomiędzy wartościami ekspresji wszystkich badanych genów tzn. *ESR1*, *ESR2*, *SOD1* i *GPXI*. W grupie kobiet z rakiem piersi istotne statystycznie korelacje wynosiły: *ESR1/ESR2* $R_s=0,3547$, *ESR1/GPX1* $R_s=0,8905$, *ESR1/SOD1* $R_s=0,9895$, natomiast dla grupy referencyjnej: *ESR1/ESR2* $R_s=0,5743$, *ESR1/GPX1* $R_s=0,6518$, *ESR1/SOD1* $R_s=0,6495$ ($p<0,05$ dla wszystkich korelacji). Ponadto w grupie kobiet zdrowych zaobserwowano dodatnią zależność pomiędzy stężeniem TBARS, a ekspresją genów *ESR2* ($R_s=0,3436$; $p<0,05$), *GPXI* ($R_s=0,3612$; $p<0,05$) i *SOD1* ($R_s=0,3653$; $p<0,05$). Również aktywność GPx1 korelowała znacząco z ekspresją genów *ESR1* ($R_s=0,2556$; $p<0,05$), *ESR2* ($R_s=0,3552$; $p<0,05$), *SOD1* ($R_s=0,3175$; $p<0,05$) i *GPXI* ($R_s=0,3472$; $p<0,05$) w tej grupie. Stężenie

TBARS znacząco korelowało z ekspresją genu *ESR2* ($R_s=0,4126$; $p<0,05$) oraz wykazano związek pomiędzy aktywnością GPx-1 i aktywnością Zn/Cu-SOD ($R_s=0,3975$; $p<0,05$).

Ponadto stwierdzono znaczący statystycznie dodatni wpływ aktywności GPx-1 na stężenie TBARS w grupie kobiet zdrowych (β -coef= 0,278; $p<0,05$) oraz wpływ ekspresji genu *ESR1* i *ESR2* oraz stężenia TBARS na ekspresję genów enzymów antyoksydacyjnych *GPXI* i *SOD1* (grupa badana: *ESR1/GPX1* β -coef= 0,989; *ESR2/GPX1* β -coef= 0,356; *ESR1 + TBARS/GPX1* β -coef= 0,991; *ESR2 + TBARS/GPX1* β -coef= 0,506; *ESR1/SOD1* β -coef= 0,908; *ESR2/SOD1* β -coef= 0,388; *ESR1 + TBARS/SOD1* β -coef= 0,910; *ESR2 + TBARS/SOD1* β -coef= 0,536; grupa kontrolna: *ESR1/GPX1* β -coef= 0,642; *ESR2/GPX1* β -coef= 0,849; *TBARS/GPX1* β -coef= 0,388; *ESR1 + TBARS/GPX1* β -coef= 0,599; *ESR2 + TBARS/GPX1* β -coef= 0,815; *ESR1/SOD1* β -coef= 0,650; *ESR2/SOD1* β -coef= 0,901; *TBARS/SOD1* β -coef= 0,390; *ESR1 + TBARS/SOD1* β -coef= 0,606; *ESR2 + TBARS/SOD1* β -coef= 0,874; $p<0,01$)

Wykazano również istotną statystycznie różnicę rozkładu genotypów *ESR1* rs3798577 pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną: dla modelu recesywnego (grupa badana: *ESR1 TT*- 31,4% i *ESR1 CT+CC*- 68,6% vs grupa kontrolna: *ESR1 TT*- 22,5% i *ESR1 CT+CC*- 77,5%; $p<0,05$) oraz znaczący statystycznie związek pomiędzy zachorowaniem na raka piersi a występującym polimorfizmem *ESR1* rs3798577, przy czym zależność ta dotyczyła modelu recesywnego rozkładu genotypów ($OR=0,624$; $p=0,039$).

Znaczącą statystycznie różnicę pomiędzy różnymi wariantami genetycznymi wykazano dla stężenia TBARS w grupie kontrolnej: kobiety o wariacie genetycznym *AG* polimorfizmu *ESR1* rs9340799 charakteryzowały się istotnie niższym stężeniem TBARS w porównaniu do kobiet o genotypie *ESR1 AA* i *ESR1 GG* (*ESR1 AG*: 2,22 nmol/ml vs *ESR1 AA*: 2,32 nmol/ml i *ESR1 GG*: 2,32 nmol/ml; $p=0,004$). Również niższe stężenie TBARS wykazano w przypadku kobiet z rakiem piersi o genotypie *ESR1 AG* w porównaniu do pacjentek z genotypem *ESR1 GG* (*ESR1 AG*: 2,25 (1,80-2,84) nmol/ml vs. *ESR1 GG*: 2,69 (2,02-3,50) nmol/ml; $p<0,05$).

Znaczące statystycznie różnice pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną o wariacie genetycznym *AA* dla polimorfizmu *ESR1* rs9340799 i *CT* dla polimorfizmu *ESR1* rs3798577 obserwowano dla aktywności Zn/Cu-SOD. Aktywność Zn/Cu-SOD była istotnie wyższa w grupie badanej w porównaniu do grupy referencyjnej (*ESR1* rs9340799 - *AA*: 6,613 (5,839-7,635) je/mg Hb vs. 6,169 (5,456-6,875) je/mg Hb; $p=0,017$ oraz *ESR1* rs3798577- *CT*: 6,578 (5,702-7,438) je/mg Hb vs. 6,299 (5,632-6,785) je/mg Hb; $p=0,013$).

Na podstawie otrzymanych wyników można sformułować następujące wnioski:

1. Istnieje silna zależność pomiędzy ekspresją genów *ESR1* i *ESR2* a ekspresją genów enzymów oksydacyjnych *GPXI* i *SOD1* bez względu na stan zdrowia kobiety.
2. Istnieje zależność pomiędzy ekspresją genów *ESR1* i *GPXI* zarówno w tkance prawidłowej jak i tkance guza kobiet z rakiem piersi, przy czym charakter tej zależności jest zbliżony w obu tkankach.

3. Zmiany profilu ekspresji genów *ESR1*, *ESR2* i *SOD1* widoczne są w leukocytach krwi obwodowej kobiet z rakiem piersi w porównaniu do kobiet zdrowych.
4. Obserwuje się związek pomiędzy polimorfizmem genetycznym *ESR1* rs3798577 a zachorowaniem na raka piersi, przy czym w grupie badanej genotyp *TT* występuje z istotnie wyższą częstością w porównaniu z grupą odniesienia, co może sugerować niekorzystną jego rolę w rozwoju raka piersi.
5. Posiadany wariant genetyczny polimorfizmów *ESR1* rs3798577 i rs9340799 nie ma wpływu na aktywność GPx-1 i Zn/Cu-SOD oraz stężenie TBARS u kobiet z rakiem piersi oraz w grupie odniesienia.

Magdalena Kwaś