

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania
w Języku Angielskim

Lek. Karol Rogowski

**Ocena modulacyjnego działania tamoksyfenu na ekspresję
i funkcję sparowanych immunoreceptorów kwasu sjałowego
Siglec-5/14 w komórkowym modelu raka piersi**

Praca doktorska

Promotor: Dr hab. n. med. Przemysław Wielgat

Pracę wykonano w Zakładzie Farmakologii Klinicznej
Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. n. med. Halina Car

Białystok, 2023

Składam serdeczne podziękowania Promotorowi pracy
dr hab. n. med. Przemysławowi Wielgatowi
za opiekę merytoryczną oraz cenne wskazówki
w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy.

Spis treści

I. Wstęp.....	10
1.1. Epidemiologia.....	10
1.2. Czynniki ryzyka	11
1.2.1. Czynniki niemodyfikowalne.....	11
1.2.2. Czynniki modyfikowalne	13
1.3. Diagnostyka.....	14
1.4. Klasyfikacja	15
1.4.1. Typy histologiczne.....	16
1.4.2. Zaawansowanie kliniczne nowotworu	16
1.4.3. Złośliwość histologiczna.....	18
1.4.4. Podtypy molekularne raka piersi	18
1.4.5. Klasyfikacja DNA.....	19
1.5. Leczenie	19
1.5.1. Leczenie chirurgiczne	19
1.5.2. Radioterapia.....	20
1.5.3. Leczenie systemowe	20
1.5.3.1. Chemioterapia	20
1.5.3.2. Immunoterapia	20
1.5.3.3. Hormonoterapia	21
1.5.3.3.1. Inhibitory aromatazy	21
1.5.3.3.2. Selektywne modulatory receptora estrogenowego	22
1.5.4. Terapia celowana.....	25
1.6. Rola układu odpornościowego w kancerogenezie	26
1.6.1. Antygeny nowotworowe	27
1.6.2. Odpowiedz immunologiczna podczas kancerogenezy	28
1.6.2.1. Komórki NK	28
1.6.2.2. Makrofagi	30
1.6.2.3. Neutrofile	31
1.6.2.4. Komórki dendrytyczne	32
1.6.2.5. Limfocyty T	33
1.7. Receptory Siglec	34
1.7.1. Definicja i nazewnictwo	34
1.7.2. Podział receptorów z rodziny Siglec.....	35

1.7.3.	Ekspresja receptorowa.....	37
1.7.4.	Przebieżność wewnątrzkomórkowa.....	39
1.7.5.	Ligandy receptorów Siglec.....	40
1.7.6.	Rola receptorów Siglec w układzie immunologicznym.....	43
1.7.7.	Rola receptorów Siglec w rozwoju chorób nowotworowych.....	44
1.7.8.	Sparowane receptory Siglec-5 i Siglec-14.....	46
II.	Cele pracy	49
III.	Materiały i metody	50
3.1.	Materiały.....	50
3.1.1.	Podłoża hodowlane i dodatki	50
3.1.2.	Odczynniki.....	50
3.1.3.	Przeciwciała, białka fuzyjne i gotowe zestawy komercyjne.....	50
3.1.4.	Materiały niezbędne do prowadzenia hodowli komórkowej	51
3.1.5.	Sprzęt.....	51
3.1.6.	Oprogramowanie.....	52
3.2.	Linie komórkowe	52
3.2.1.	Linia komórkowa ludzkiego raka sutka MCF-7.....	52
3.2.2.	Linia komórkowa ludzkiego raka sutka MDA-MB-231.....	53
3.2.3.	Linia komórkowa ludzkiej białaczki monocytarnej THP-1.....	54
3.3.	Metody	55
3.3.1.	Hodowle komórkowe	55
3.3.2.	Badanie wpływu tamoksyfenu na żywność MCF-7, MDA-MB-231 i THP-1....	55
3.3.2.1.	Test MTT.....	56
3.3.2.2.	Test migracji (test „gojenia rany”)	57
3.3.3.	Badanie wpływu tamoksyfenu na aktywność immunologiczną komórek THP-1..	58
3.3.3.1.	Oznaczenie stężenia cytokin	59
3.3.3.2.	Analiza markerów różnicowania monocytów linii THP-1 i ich fenotypu immunologicznego	59
3.3.4.	Badanie wpływu tamoksyfenu na ekspresję sparowanych receptorów Siglec-5/14 i elementów wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych	60
3.3.4.1.	Oznaczenie ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 metodą cytometrii przepływowej	60
3.3.4.2.	Badanie poziomu ekspresji genów metodą Real-time PCR.....	61

3.3.5. Ocena wiązania białek fuzyjnych Siglec-5 Fc i Siglec-14 Fc do komórek nowotworowych MCF-7 i MDA-MB-231	63
3.4. Analiza statystyczna	63
IV. Wyniki	64
4.1. Wpływ tamoksyfenu na żywotność komórek raka sutka linii MCF-7 i MDA-MB-231 oraz monocytów linii THP-1 hodowanych w warunkach monokultury i kokultury.....	64
4.2. Ocena wpływu tamoksyfenu na potencjał migracyjny komórek raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 w warunkach monokultury lub w kokulturze z monocytami linii THP-1	66
4.3. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję cytokin w monokulturach monocytów linii THP-1 i kokulturach z komórkami raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231	70
4.4. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję CD68 w monokulturach monocytów linii THP-1 i kokulturach z komórkami raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231.....	73
4.5. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję arginazy-1 w monokulturach monocytów linii THP-1 i kokulturach z komórkami raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231.	76
4.6. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję sparowanych receptorów Siglec-5/14 w monokulturach monocytów linii THP-1 i kokulturach z komórkami raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231.....	79
4.7. Ocena ekspresji genów SIGLEC5, SIGLEC14, PTPN6, PTPN11 i TYROBP monokulturach monocytów linii THP-1 i kokulturach z komórkami raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231..	81
4.8. Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białek fuzyjnych Siglec-5/Fc i Siglec-14/Fc z komórkami raka sutka linii MCF-7 i MDA-MB-231.	83
V. Dyskusja	90
VI. Wnioski.....	102
VII. Streszczenie	103
VIII. Abstract	105
IX. Wykaz tabel i rycin.....	107
Literatura.	110

Objaśnienia stosowanych skrótów:

AKT	ang. protein kinase B; kinaza białkowa B
ALND	ang. axillary lymph node dissection; limfadenektomia - całkowite wycięcie węzłów chłonnych I i II piętra pachy
BAC	biopsja aspiracyjna cienkoigłowa
BAG	biopsja gruboigłowa
BCT	ang. breast-conserving therapy; leczenie oszczędzające piersi z zachowaniem piersi
BI-RADS	ang. breast imaging-reporting and data system; skala oceniania zdjęć mammograficznych piersi
CCL2	ang. chemokine ligand 2; ligand chemokiny 2
CD4+	ang. cluster of differentiation 4; antygen różnicowania komórkowego 4
CD8+	ang. cluster of differentiation 8; antygen różnicowania komórkowego 8
CTLA-4	ang. cytotoxic T cell antigen 4; antygen - 4 cytotoksycznych limfocytów T
DAP12	ang. DNAX activating protein of 12 kDa; białko aktywujące DNAX o masie 12 kDa
DMSO	ang. dimethyl sulphoxide; dimetylosulfotlenek
dNTP	ang. deoxyribonucleotide triphosphate; trójfosforan deoksyrybonukleotydu
EDTA	ang. ethylenediaminetetraacetic acid; kwas wersenowy
ER	receptor estrogenowy
FBS	ang. fetal bovine serum; płodowa surowica bydlęca
FISH	ang. fluorescent in situ hybridization; fluorescencyjna hybrydyzacja in situ
FITC	ang. fluorescein; fluoresceina
GAPDH	ang. glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
GMCSF	ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
GR	ang. glucocorticoid receptor; receptor glikokortykoidowy
HER2	ang. human epidermal growth factor receptor 2; receptor 2 ludzkiego epidermalnego czynnika wzrostu
HLA	ang. human leukocyte antigens; antygeny zgodności tkankowej
HPV	ang. human papilloma virus; ludzki wirus brodawczaka
IA	inhibitory aromatazy

IFNα	ang. interferon α , interferon α
IFNγ	ang. interferon γ ; interferon γ
IHC	ang. immunohistochemistry; badanie immunohistochemiczne
IKK-β	ang. inhibitor nuclear factor kappa-Beta Kinase; inhibitor kinazy kappa-beta
IL-1β	ang. interleukin 1 β ; interleukina 1 β
IL-2	ang. interleukin 2; interleukina 2
IL-4	ang. interleukin 4; interleukina 4
IL-6	ang. interleukin 6; interleukina 6
IL-8	ang. interleukin 8; interleukina 8
IL-10	ang. interleukin 10; interleukina 10
IL-12p70	ang. interleukin 12p70; interleukina 12p70
IL-13	ang. interleukin 13; interleukina 13
IL-17	ang. interleukin 17; interleukina 17
IL-35	ang. interleukin 35; interleukina 35
iNOS	ang. inducible nitric oxide synthase; indukowana syntaza tlenku azotu
ITAM	ang. immunoreceptor tyrosine-based activatory motifs; immunoreceptorowy motyw aktywujący oparty o tyrozynę
ITIM	ang. immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; immunoreceptorowy motyw hamujący oparty o tyrozynę
JAK	ang. janus-activated kinase; kinazy janusowe
kinaz MAP	ang. mitogen-activated protein kinases; kinazy aktywowane mitogenami
KIR	ang. killer cell immunoglobulin-like receptors; receptory należące do nadrodziny cząsteczek immunoglobulinopodobnych
LAG-3,	ang. lymphocyte activation gene-3; gen-3 aktywujący limfocyty
LMP	ang. low molecular weight protein; białko o niskiej masie cząsteczkowej
LPS	ang. lipopolysaccharide; lipopolisacharyd
MAPK	ang. ras/mitogen-activated protein kinase; kinaza białkowa aktywowana mitogenami
MDSC	ang. myeloid-derived suppressor cells; mieloidalne komórki supresorowe
MHC-1	ang. major histocompatibility complex- class I molecules; cząsteczki układu zgodności tkankowej klasy I
MHC-2	ang. major histocompatibility complex- class II molecules; cząsteczki układu zgodności tkankowej klasy II

MMP	ang. matrix metalloproteinases; metaloproteinazy macierzy
MRI	ang. magnetic resonance imaging; rezonans magnetyczny
NKG2D	ang. natural killer group 2, D protein; białko D komórek NK grupy 2
NF-KB	ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; kompleks białkowy działający jako czynnik transkrypcyjny kappa B
NK	ang. natural killers; urodzeni zabójcy
NO	ang. nitric oxide; tlenek azonu
Nrf2	ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2; czynnik jądrowy erytroidalny 2 związany z czynnikiem 2
PBS	ang. phosphate buffered saline; sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PD-1	ang. programmed death-1; receptor programowanej śmierci 1
PD-L1	ang. programmed death ligand 1; ligand programowanej śmierci 1
PenStrep	ang. penicillin-streptomycin; penicylina-streptomycyna
PGE-2	prostaglandyna E2,
PgR	receptor progesteronowy
PI3K	ang. phosphoinositide 3-kinase; kinaza 3-fosfoinozytydu
PKC	ang. protein kinase C; kinaza białkowa C
PMA	ang. phorbol-12-myristate-13-acetate; mirystynian-13-octan forbolu
PPARγ	ang. peroxisome proliferator-activated receptor γ ; receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów γ
PTPN6	ang. protein tyrosine phosphatase non-receptor type 6; niereceptorowa białkowa fosfataza tyrozynowa typu 6
PTPN11	ang. protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11; niereceptorowa białkowa fosfataza tyrozynowa typu 11
RTK	ang. receptor tyrosine kinase, receptor kinazy tyrozynowej
SAMP	ang. self-associated molecular pattern, wzorce molekularne antygenów
Siglec	ang. selective estrogen receptor modulator; selektywny modulator receptora estrogenowego
SHP-1	ang. tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6; niereceptorowa fosfataza tyrozynowo-białkowa typu 6
SHP-2	ang. tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11; niereceptorowa fosfataza tyrozynowo-białkowa typu 11

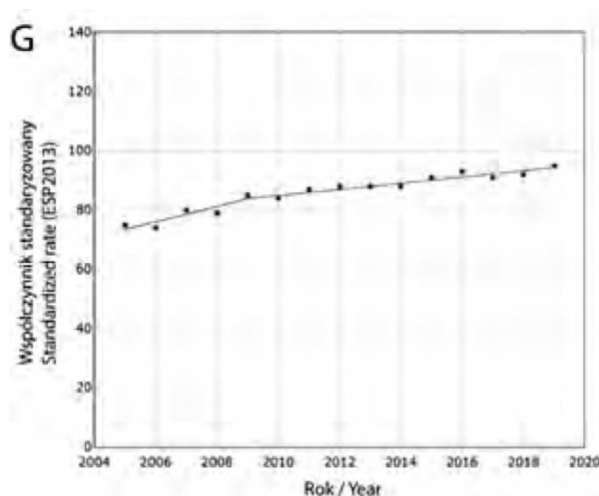
Siglec	ang. sialic acid binding immunoglobulin like lectin; immunoglobulinopodobna lektyna wiążąca kwas sjałowy
SLN	ang. sentinel lymph node; biopsja węzła wartowniczego
STAT1	ang. signal transducer and activator of transcription 1; przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 1
ST3Gal1	ang. beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1; beta-galaktozyd alfa-2,3-sjałotransferazy 1
ST3Gal4	ang. beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4; beta-galaktozyd alfa-2,3-sjałotransferazy 4
ST6Gal1	ang. beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1; beta-galaktozyd alfa-2,6-sjałotransferazy 1
ST8Sia2	ang. alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2; alfa-N-acetylo-neuraminid alfa-2,8-sjałotransferazy 2
TGCA	ang. the genome cancer atlas; atlas genomu raka
TGF-β	ang. transforming growth factor - β ; transformujący czynnik wzrostu beta
TIDC	ang. tumor infiltrating dendritic cells; komórki dendytyczne naciekające nowotwór
TILs	ang. tumor-infiltrating lymphocytes; limfocyty naciekające guz
TLR	ang. toll-like receptor; receptory toll-podobne
TMEM	ang. tumor microenvironment of metastasis; mikrośrodowiski przerzutu nowotworu
TNF	ang. tumor necrosis factor; czynnik martwicy nowotworu
TNM	ang. tumor node metastasis; klasyfikacja nowotworów: guz (pierwotny), węzeł (chłonny), przerzut (odległy)
Treg	ang. regulatory T cells, regulatorowa komórka T
TYROBP	ang. protein tyrosine kinase binding protein; białko wiążące kinazę tyrozynową
VEGF	ang. vascular endothelial growth factor; naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu

I. WSTĘP

Rak piersi jest nowotworem złośliwym powstającym z komórek gruczołu piersiowego. Najczęściej rozwija się miejscowo i objawia się macalnym, niebolesnym guzem w piersi. Rak ten może powodować zmianę kształtu piersi, zaciągnięcie skóry nad guzem, wciągnięcie brodawki, patologiczny wyciek z brodawki oraz zaczerwienienie i pomarszczenie skóry piersi [1]. Jako nowotwór złośliwy wywodzący się z tkanki nabłonkowej daje przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych i odległych narządów wewnętrznych (kości, wątroba, płuca i mózg) [2]. Ponadto, przy rozsianej postaci tej choroby głównymi dolegliwościami są utrata wagi, bóle kostne, obrzęk węzłów chłonnych, duszność, żółtaczka i objawy neurologiczne [3,4].

1.1. Epidemiologia

Rak piersi stanowi 25.2% wszystkich nowotworów inwazyjnych u kobiet na świecie i jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet. Zachorowalność jest ściśle związana z wiekiem, o czym świadczy niska rozpoznawalność u 5% kobiet poniżej 40 roku życia. W ciągu ostatnich trzydziestu lat tendencje zachorowalności i umieralności na raka piersi u kobiet ulegały ciągłym zmianom. Początkowo, w latach 90 ubiegłego wieku umieralność z powodu tego nowotworu została zahamowana, zaś w latach 1996-2005 odnotowano jej spadek. Obecnie, w okresie 2006-2020 nastąpiła niekorzystna tendencja, co oznacza, że umieralność z powodu guza piersi w Polsce systematycznie rośnie. Statystykę zachorowalności u kobiet w latach 2005-2019 przedstawia Rycina 1.



Rycina 1. Zachorowalność na nowotwór złośliwy piersi u kobiet w Polsce w latach 2005-2020 [7].

W rezultacie, w 2020 roku zanotowano 6956 zgonów. W skali globalnej, zarówno zachorowalność jak i umieralność na raka piersi na świecie systematycznie wzrasta, czego przyczyną jest wydłużenie średniej długości życia, zmiana stylu życia oraz lepsza wykrywalność [5,6,7].

1.2. Czynniki ryzyka

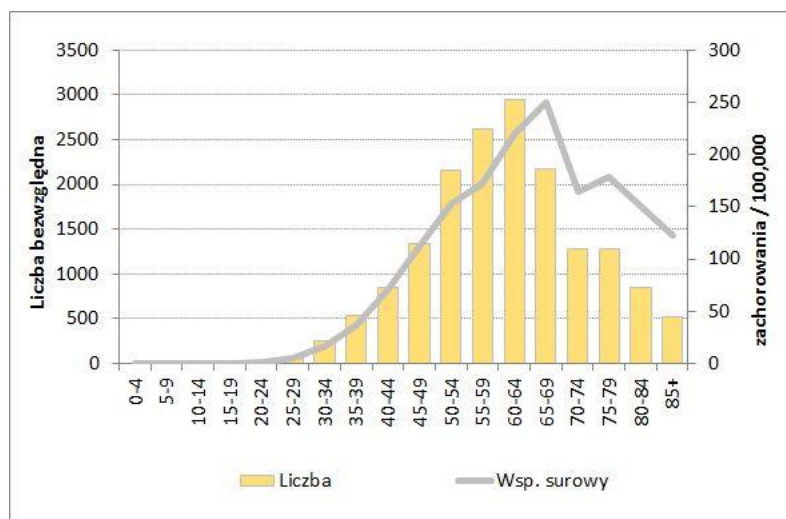
W etiopatogenezie raka piersi kluczową rolę wiele czynników, które można podzielić na dwie główne grupy: czynniki modyfikowalne, np. styl życia i układ hormonalny, oraz niemodyfikowalne, np. płeć i czynniki genetyczne.

1.2.1. Czynniki niemodyfikowalne

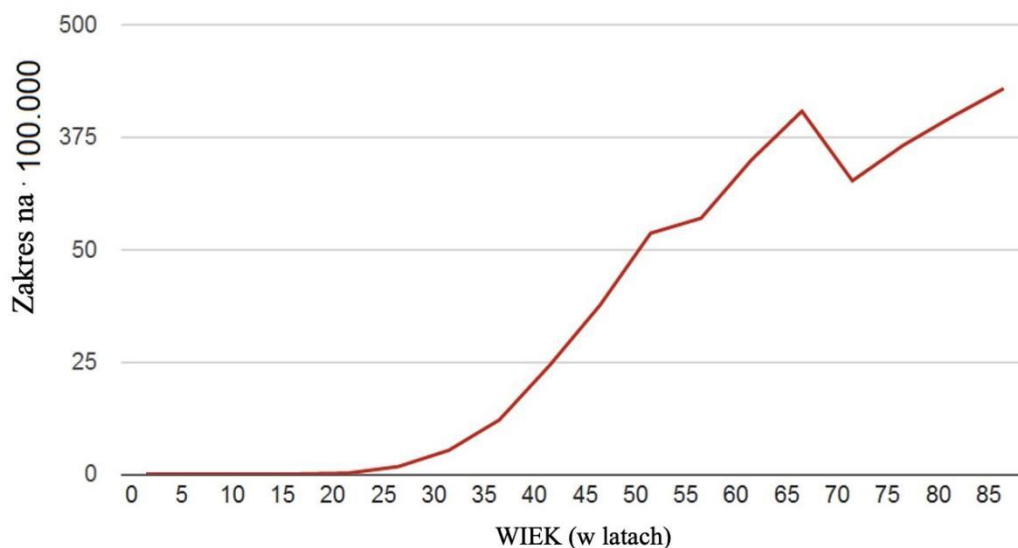
Wiek

Jak wspomniano, ryzyko rozwoju raka piersi rośnie wraz z wiekiem. Około 80% zachorowań dotyczy pacjentek po ukończeniu 50 roku życia. Największy wzrost ryzyka dotyczy kobiet w wieku 50-69 lat, co stanowi około 50% wszystkich zachorowań. Szacuje się, że 1 na 8 kobiet w wieku 95 lat zachoruje na raka piersi [8].

Poniżej przedstawione zostały dane zachorowalności na raka piersi w Polsce w latach 2011-2013 w zależności od wieku (Rycina 2) oraz porównawczo zachorowalność na tę chorobę w Wielkiej Brytanii w latach 2006-2008 (Rycina 3) [9].



Rycina 2. Zachorowalność na raka piersi w Polsce w latach 2011-13 w zależności od wieku [9].



Rycina 3. Zachorowalność na raka piersi w Wielkiej Brytanii w latach 2006-2008 w zależności od wieku [9].

Płeć

Badania wskazują, że rak piersi jest ściśle związany z płcią. Około 99% rozpoznań tej choroby dotyczy kobiet. W grupie mężczyzn zapadalność na raka piersi jest 100 razy rzadsza i stanowi około 1% zachorowań. Przykładem, który dobrze obrazuje tę dysproporcję jest rok 2018, w którym w Polsce zanotowano łącznie 18869 przypadków zachorowań na raka piersi u kobiet oraz 154 przypadki wystąpienia tej choroby u mężczyzn. Dane statystyczne sugerują, że mężczyźni zapadają na raka piersi rzadziej i zazwyczaj w późniejszym wieku względem kobiet, przy czym zaznaczyć należy, że takie rozpoznanie cechuje się gorszym rokowaniem [10].

Czynniki genetyczne

Zespoły genetyczne odpowiadają za około 5-10% wszystkich przypadków wystąpienia raka piersi. Wśród nich mutacje autosomalne dominujące genów BRCA1 oraz BRCA2 stanowią do 90% (odpowiednio 50% i 33%) [11]. Ryzyko rozwoju guza przed 70 r.ż. u pacjentek z mutacją BRCA1 sięga 50-65%, natomiast z BRCA2 40-57%. Oba geny wiążą się również ze zwiększoną zachorowalnością na raka jajnika (odpowiednio 35-46% oraz 13-23%) [12,13]. Szacuje się, że około 45% wszystkich dziedzicznych raków piersi jest związana z mutacjami dotychczas niepoznanyymi lub ich gena jest wielogenowa [12].

Zespoły genetyczne zwiększające ryzyko zachorowania na raka piersi przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Zespoły genetyczne zwiększające ryzyko zachorowania na raka piersi.

Zespół genetyczny	Mutacja w genie
rodzinny rak piersi typu 1	BRCA1
rodzinny rak piersi typu 2	BRCA2
zespół Li-Fraumeni	TP53
choroba Cowden	PTEN
zespół Lyncha II	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2
zespół Peutza-Jeghersa	STK11
zespół Bannayana-Rileya-Ruvalcaby	PTEN
zespół ataksja-teleangiektazja	ATM
inne mutacja	PALB2, CHEK2

1.2.2. Czynniki modyfikowalne

Styl życia

W tej grupie czynników jako czołowe wymienić przede wszystkim należy spożywanie alkoholu oraz otyłość pacjentek. Rocznie na świecie rozpoznaje się około 144000 nowych raków piersi indukowanych przez nadmierne spożywanie alkoholu. Przyjmuje się, że spożywanie nawet niewielkiej jego ilości (1-3 jednostki alkoholu tygodniowo) przyczynia się do zwiększenia zachorowalności na tę chorobę. Ilość spożytego alkoholu wpływa liniowo na wzrost ryzyka rozwoju nowotworu [14].

Ponadto, obserwuje się obecnie, że pacjentki z otyłością oraz ograniczoną aktywnością fizyczną mają większe rozmiary guzów w trakcie rozpoznania, przerzutowe węzły chłonne oraz gorsze rokowanie, co średnio zwiększa ich śmiertelność o 30% [15]. Tkanka tłuszczowa bowiem jako tkanka aktywna metabolicznie nie tylko konwertuje androgeny w estrogeny, ale również produkuje szereg czynników prozapalnych (TNF α , IL-6) wpływając na patogenezę nowotworów [16,17].

Wśród pozostałych czynników modyfikowalnych sygnalizacyjnie należy wymienić: palenie papierosów, bierne palenie, narażenie na kancerogeny (ksenoestrogeny, bisfenol A, dioksyny) i promieniowanie jonizujące [18].

Układ hormonalny

Ciągły stan podwyższenia poziomu estrogenów we krwi zwiększa ryzyko rozwoju raka piersi. Pacjentki, które nie rodziły dzieci mają 3-krotnie większe ryzyko zachorowania na nowotwór piersi od kobiet po przebytych porodach. Przyjmuje się, że każde urodzenie dziecka

zmniejsza szanse rozwoju nowotworu gruczołu piersiowego średnio o 7%, zaś rok karmienia piersią zmniejsza te szanse o dodatkowe 4,3% [19,20]. Z kolei czynniki takie jak późny pierwszy poród, niekarmienie piersią, wczesna pierwsza miesiączka czy późna menopauza są sytuacjami, które w ciągu życia mogą zwiększać ryzyko rozwoju tej choroby [21].

1.3. Diagnostyka

Jedną z głównych metod diagnostycznych guza jest badanie palpacyjne piersi. Można je podzielić na dwa rodzaje: samobadanie piersi przez pacjentkę oraz badanie przedmiotowe wykonywane przez wykwalifikowany personel medyczny. Ponad 80% przypadków raka jest wykrywanych podczas samobadania, gdy pacjentka przy pomocy palców samodzielnie wyczuwa w piersi guza [22]. Mimo prostoty badania, badanie palpacyjne nie jest zalecane jako podstawowe badanie skryningowe. Wynika to z tego, że wykryty palpacyjnie guz jest zazwyczaj na tyle duży, że najprawdopodobniej istnieje już od kilku lat [23,24].

Głównym i podstawowym badaniem przesiewowym pozwalającym na wczesne wykrycie raka gruczołu piersiowego jest mammografia piersi. Jest to badanie obrazowe wykorzystujące niskodawkowe promienie rentgenowskie, które bezpiecznie i efektywnie pozwala na wykrycie patologicznych przejaśnień lub cieni, mikrozwapnień, patologicznych naczyń w piersi, wciągnięcia brodawki sutkowej oraz powiększonych węzłów chłonnych [25,26]. Aby uzyskać zdjęcie mammograficzne prawidłowej jakości piersi muszą charakteryzować się zmniejszoną ilością tkanki gruczołowo-włóknistej. Stąd też badanie to jest rzadko wykonywane u kobiet poniżej 40 r.ż. [27,28,29].

Istotnym badaniem wspomagającym mammografię jest badanie ultrasonograficzne piersi. Pozwala ono na różnicowanie zmian płynowych od guzów litych oraz znacznie zwiększa czułość badań diagnostycznych, zwłaszcza u pacjentek młodych z gruczołową budową piersi oraz u osób z podwyższonych grup ryzyka [30,31].

Ponadto, alternatywną metodą radiologiczną wykorzystywaną w diagnostyce chorób piersi jest obrazowanie za pomocą rezonansu magnetycznego (MRI). Badanie wzmocnione podaniem kontrastu dożylnego (środka gadolinowego) charakteryzuje się wysoką czułością na poziomie 94% [32]. Wśród wskazań do wykonania MRI piersi pacjentek wyróżniamy: rodzinny wywiad nowotworowy raka piersi, mutacje genetyczne (m.in. BRCA1 i BRCA2), przebyte rekonstrukcje piersi implantami, przerzutowe węzły chłonne o nieznanym punkcie wyjścia, silnie gruczołowe utkanie piersi, pacjentki po lub przed planowanymi rozległymi operacjami piersi [33]. Poza ryzykiem związanym z podaniem kontrastu, parametrem ograniczającym stosowanie MRI jest dość szeroki zakres swoistości (37-97%) (średnia swoistość mniejsza od

swoistości mammografii). W rezultacie otrzymujemy około 30% więcej wyników fałszywie dodatnich, co ma ogromny wpływ na psychikę pacjenta i ewentualne koszty leczenia [34].

W ostatnich latach szczególnego znaczenia nabrały badania genetyczne. Nie służą one do rozpoznawania choroby nowotworowej, lecz jako testy dziedzicznej predyspozycji mogą wskazać grupę konkretnych pacjentów ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka w trakcie życia. Geny, które w Polsce są badane najczęściej to: BRCA1, BRCA2, CHEK2, NOD2. Jest to związane z tzw. efektem założyciela, który dotyczy populacji jednorodnych etnicznie [35]. Występowanie dziedzicznego raka piersi wymaga ścisłej kontroli, a w przypadku mutacji BRCA1 zaleca się profilaktyczne usunięcie jajników i piersi [36].

Ostateczne rozpoznanie raka piersi opiera się na wyniku histopatologicznym pobranej tkanki. Materiał pobierany jest na drodze biopsji piersi. Dostępne są różne techniki uzyskania bioptatu piersi, wśród których wymieniamy biopsje przezskórne wykonywane w znieczuleniu miejscowym: biopsja aspiracyjna cienkoigłowa (BAC), biopsja grubo igłowa (BAG) (czasem z wykorzystaniem aparatury VAB, tzw. biopsja mammotomiczna próżniowa) oraz otwarta biopsja chirurgiczna. Ilość pobranego materiału do badania, ocena inwazyjności zmiany nowotworowej oraz określenie statusu receptorowego raka, wpływają na trafność diagnozy [37]. Postęp w zakresie sposobu poboru materiału a także wsparcie technik radiologicznych podnosi znamienne czułość metody biopsyjnej [38].

Wraz z rozwojem wielodyscyplinarnego sposobu leczenia raka piersi w ostatnich latach biopsja chirurgiczna otwarta utraciła na znaczeniu na rzecz biopsji mniej inwazyjnych. Biopsja ta wykonywana jest w znieczuleniu w warunkach sali operacyjnej i wykorzystywana jest głównie w sytuacjach niejednoznacznych, w których pozostałe narzędzia diagnostyczne nie pozwalają na ustalenie pełnego rozpoznania. Cechuje się bardzo wysoką czułością na poziomie 98-99%. Większość usuniętych guzów na drodze biopsji otwartej w raportach patomorfologicznych okazuje się jednak być zmianami łagodnymi, co mocno ogranicza słuszność i zasadność tej metody (około 75%) [39].

1.4. Klasyfikacja

Pełna klasyfikacja raka piersi opiera się na wielu kryteriach, wśród których najważniejsze to: typ histologiczny (z rozróżnieniem na raki inwazyjne i przedinwazyjne), zaawansowanie kliniczne nowotworu (staging) oceniane w skali TNM, złośliwość histologiczna (grading), status receptorowy komórki nowotworowej (podtypy molekularne) oraz klasyfikacja DNA. Dokładna ocena wszystkich parametrów guza pozwala ocenić rokowanie, agresywność oraz

przeżywalność, a następnie wybrać oraz wdrożyć optymalne wielodyscyplinarne postępowanie lecznicze.

1.4.1. Typy histologiczne

Rak piersi histologicznie jest bardzo zróżnicowaną grupą nowotworów [40]. Podział obejmuje:

- a) nowotwory złośliwe sutka przedinwazyjne:
 - rak przewodowy in situ (carcinoma intraductale in situ, DCIS)
 - rak zrazikowy in situ (carcinoma lobulare in situ, LCIS)
- b) nowotwory złośliwe sutka inwazyjne (naciekające):
 - rak przewodowy inwazyjny (NOS, NST, IDC)
 - rak zrazikowy inwazyjny (ILC)
 - rak rdzeniasty
 - rak śluzowy
 - rak cewkowy (rak cewkowaty)
 - rak z metaplazją
 - rak apokryalny
 - rak brodawkowaty (rak brodawkowy)

1.4.2. Zaawansowanie kliniczne nowotworu

Staging jest określany w jednolitej międzynarodowej skali TNM. Nazwa pochodzi od pierwszych liter słów angielskich: T-tumour (guz pierwotny), N-node (węzeł chłonny), M-metastasis (przerzut odległy). Klasyfikację TNM raka piersi przedstawiono poniżej, w Tabeli 2a oraz Tabeli 2b. Stopnie zaawansowania klinicznego przedstawiono na Rycinie 4.

0	Tis	N0	M0	IIIA	T0	N2	M0	IIIB	T4	N0	M0
IA	T1*	N0	M0		T1*	N2	M0		T4	N1	M0
IB	T0	N1mi	M0		T2	N2	M0		T4	N2	M0
	T1*	N1mi	M0		T3	N1	M0	Stage IIIC	Any T	N3	M0
IIA	T0	N1**	M0		T3	N2	M0	Stage IV	Any T	Any N	M1
	T1*	N1**	M0								
	T2	N0	M0								
IIB	T2	N1	M0								
	T3	N0	M0								

Rycina 4. Stopnie zaawansowania klinicznego raka piersi [41].

Tabela 2a. Klasyfikacja TNM raka piersi określająca cechą T (guz pierwotny) [41].

Tis	rak przedinwazyjny (<i>in situ</i>)
Tis (DCIS)	rak przewodowy <i>in situ</i>
Tis (LCIS)	rak zrazikowy <i>in situ</i>
Tis (rak Pageta)	rak Pageta brodawki sutkowej bez obecności komponentu raka naciekającego i/lub raka <i>in situ</i> (DCIS i/lub LCIS) w obrębie mięszu piersi; raki w obrębie mięszu piersi z towarzyszącym rakiem Pageta są klasyfikowane zgodnie z wielkością i charakterystyką guza znajdującego się w gruczole, niemniej obecność raka Pageta powinna być także odnotowana.
T1mi	największy wymiar guza ≤ 1 mm
T1a	największy wymiar guza > 1 mm i ≤ 5 mm
T1b	największy wymiar guza > 5 mm i ≤ 10 mm
T1c	największy wymiar guza > 10 mm i ≤ 20 mm
T2	największy wymiar guza > 20 mm i ≤ 50 mm
T3	największy wymiar guza > 50 mm
T4	guz dowolnej wielkości naciekający przez ciągłość ścianę klatki piersiowej i/lub skórę (owrzodzenie lub guzki satelitarne skóry) Uwaga! Naciekanie skóry (bez owrzodzenia lub guzków satelitarnych) nie stanowi podstawy do zakwalifikowania zmiany jako T4.
T4a	naciekanie ściany klatki piersiowej (wyłączne przyleganie/naciekanie m. piersiowych nie jest wystarczające, aby guz zakwalifikować jako T4a)
T4b	owrzodzenie i/lub guzki satelitarne skóry po tej samej stronie i/lub obrzęk skóry (w tym objaw skórki pomarańczowej) niespełniający kryteriów raka zapalnego
T4c	T4a i T4b jednocześnie
T4d	rak zapalny

Tabela 2b. Klasyfikacja TNM raka piersi określająca cechą N (przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych) oraz cechą M (przerzuty odległe) [41].

N1	przerzuty w ruchomych węzłach (węzły) chłonnych I–II piętra pachy po stronie guza
N2	przerzuty w klinicznie nieruchomych lub tworzących pakiet węzłach chłonnych I–II piętra pachy po stronie guza lub stwierdzone klinicznie przerzuty w węzłach piersiowych wewnętrznych po tej samej stronie, przy braku klinicznie podejrzanych węzłów pachowych
N2a	przerzuty w klinicznie nieruchomych lub tworzących pakiety węzłach chłonnych I–II piętra pachy po stronie guza
N2b	stwierdzone klinicznie przerzuty w węzłach piersiowych wewnętrznych po stronie guza przy braku klinicznie podejrzanych węzłów pachowych
N3	przerzuty w węzłach (węzły) podobojczykowych po stronie guza (III piętro pachy) z zajęciem lub bez zajęcia węzłów pięter I i II; stwierdzone klinicznie przerzuty w węzłach (węzły) piersiowych wewnętrznych po stronie guza przy jednoznacznie klinicznie zmienionych węzłach piętra I i II pachy; przerzuty w węzłach (węzły) nadobojczykowych po stronie guza z zajęciem lub bez zajęcia węzłów chłonnych pachy lub piersiowych wewnętrznych
N3a	przerzuty w węzłach (węzły) podobojczykowych po stronie guza (III piętro pachy)
N3b	przerzuty w węzłach (węzły) piersiowych wewnętrznych po stronie guza oraz w węzłach (węzły) piętra I i II pachy

N3c	przerzuty w węzłach (węzły) nadobojczykowych po stronie guza
M1	przerzuty odległe

1.4.3. Złośliwość histologiczna

Stopniowanie złośliwości histologicznej („grading”) ocenia architekturę tkanki nowotworowej oraz cechy cytologiczne komórek nowotworowych (stopień anaplazji, wielkość i kształt jąder komórkowych, objętość cytoplazmy oraz względny odsetek dzielących się komórek -indeks mitotyczny). Oceniany jest w trzy stopniowej skali: G1 – rak wysoko zróżnicowany (niski stopień złośliwości), G2 – rak średnio zróżnicowany (pośredni stopień złośliwości), G3 – rak nisko zróżnicowany (wysoki stopień złośliwości). Jest to parametr, który wpływa na przebieg choroby, zdolność naciekania, inwazji tkanek oraz tworzenie przerzutów odległych [42].

1.4.4. Podtypy molekularne raka piersi

Jednym z przełomowych kryteriów w nowoczesnej onkologii, wpływającym na rodzaj wybranego i wdrożonego leczenia wielodyscyplinarnego jest ustalenie statusu receptorowego komórki nowotworowej raka piersi. Określany jest on za pomocą badań immunohistochemicznych (IHC), w których przy zastosowaniu przeciwciał wykrywano są substancje antygenowe w skrawkach mikroskopowych komórek. W raku piersi najczęściej oznacza się: receptor estrogenowy (ER), receptor progesteronowy (PgR), receptor HER2 oraz białko Ki-67 jako komórkowy wskaźnik proliferacji. Odpowiednia kombinacja wymienionych receptorów pozwala podzielić raka gruczołu piersiowego na 4 główne podtypy molekularne przedstawione w Tabeli 3 [43]. Dokładna analiza ekspresji receptorów na błonie komórki nowotworowej wyznacza strategię leczenia neoadiuwantowego i adiuwantowego w oparciu o leki antyestrogenowe (selektywne modulatory receptora estrogenowego (SERM), inhibitory aromatazy) oraz rekombinowane humanizowane przeciwciała monoklonalne anty-HER2, które wpływają znacząco na efektywność kompleksowego leczenia raka piersi.

Tabela 3. Podtypy molekularne raka piersi.

	Luminalny A	Luminalny B	HER2 dodatni	Potrójnie ujemny (triple negative)
IHC	<ul style="list-style-type: none"> – dodatnie receptory estrogenowe (ER+) – dodatnie receptory progesteronowe (PgR+ powyżej 20%) 	<ul style="list-style-type: none"> – dodatnie receptory estrogenowe (ER+) – ujemne receptory progesteronowe 	<ul style="list-style-type: none"> – HER2 dodatni – ujemne receptory estrogenowe oraz progesteronowe 	<ul style="list-style-type: none"> – ujemne receptory estrogenowe, progesteronowe oraz HER2

	<ul style="list-style-type: none"> - HER2 ujemny - niskie Ki67 	(PgR+ poniżej 20%) <ul style="list-style-type: none"> - HER2 ujemny lub dodatni - wysokie Ki67 		
--	----------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

1.4.5. Klasyfikacja DNA

Współczesne metody diagnostyczne pozwalają wykryć w materiale genetycznym określoną sekwencję DNA. Jedną z metod wykorzystywanych w raku piersi jest fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH, od ang. fluorescent in situ hybridization) pozwalająca ocenić status receptora HER2 [44]. Metoda FISH pozwala na dokładniejszą ocenę statusu receptorowego w sytuacjach, w których wynik immunohistochemiczny jest niejednoznaczny. Najnowsze badania komercyjne pozwalają również na ocenę ekspresji genów za pomocą mikromacierzy DNA (Oncotype DX, MammaPrint) [45]. Otrzymane wyniki mogą wpływać na klasyfikację choroby, rokowanie oraz rodzaj wdrożonego leczenia [46].

1.5. Leczenie

1.5.1. Leczenie chirurgiczne

Chirurgiczne leczenie zmian nowotworowych piersi wciąż pozostaje głównym narzędziem w walce z rakiem. W zakresie technik operacyjnych gruczołu piersiowego możemy wyróżnić leczenie oszczędzające pierś (BCT z ang. breast-conserving therapy) oraz mastektomię z częściowym lub całkowitym usunięciem piersi [47].

W obu metodach najważniejszym parametrem wpływającym na sukces terapeutyczny jest radykalne wycięcie zmian z ujemnymi marginesami chirurgicznymi w pooperacyjnym materiale histopatologicznym (margines R0 - nowotwór usunięty w zakresie zdrowych tkanek makroskopowo i mikroskopowo). Niezbędnym elementem leczenia jest również jednoczasowa operacja w zakresie dołu pachowego. W sytuacji potwierdzonego w toku przedoperacyjnej diagnostyki występowania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (pN+) postępowaniem z wyboru w pierwotnym leczeniu jest limfadenektomia tj. całkowite wycięcie węzłów chłonnych I i II piętra pachy (ALND, z ang. axillary lymph node dissection). W sytuacji klinicznie niezmiennych węzłów chłonnych (cN0) wykorzystuje się procedurę biopsji węzła wartowniczego (SLN, z ang. sentinel lymph node) [48]. Wybarwiony i/lub zlokalizowany za pomocą techniki izotopowej SLN, a następnie usunięty i poddany rutynowemu badaniu histopatologicznemu umożliwi ocenę stanu zaawansowania nowotworu.

1.5.2. Radioterapia

Przeprowadzana po zabiegu operacyjnym radioterapia jest jedną z podstawowych metod uzupełniającego leczenia raka. Obszar napromieniania obejmuje miejsce po usuniętym guzie (tzw. łożo nowotworowe) oraz ewentualnie dół pachowy i/lub nadobojczykowy. Może być wykonywana za pomocą teleterapii (zewnętrzna wiązka promieniowania) lub brachyterapii (źródło promieniowania wprowadzane w miejsce guza). Wśród najważniejszych wskazań do uzupełniającej radioterapii wymienić trzeba: leczenie oszczędzające pierś, cecha T3 (pierwotna wielkość guza >5cm) oraz znaczne zajęcie regionalnych węzłów chłonnych. Zadaniem promieniowania jest zniszczenie pozostawionych po operacji pojedynczych komórek nowotworowych. Zastosowanie pełnej dawki radioterapii zmniejsza ryzyko wznowy miejscowej o 50-66% [49].

1.5.3. Leczenie systemowe

1.5.3.1. Chemioterapia

Leki cytotoksyczne znajdują wiele zastosowań w leczeniu raka piersi. Po pierwsze, mogą być stosowane w terapii neoadiuwantowej (leczenie przedoperacyjne) celem zmniejszenia pierwotnego stopnia zaawansowania choroby nowotworowej. Terapia adiuwantowa (leczenie pooperacyjne) stosowana jest u pacjentów z gorszym rokowaniem, celem zmniejszenia ryzyka wznowy raka. Chemioterapia paliatywna spowalnia rozwój przerzutowego raka piersi oraz powinna poprawiać jakość życia pacjentów. Ze względu na silną toksyczność i liczne objawy niepożądane, chemioterapia stosowana jest u pacjentów w stosunkowo młodym wieku biologicznym, z wyższym stopniem zaawansowania choroby (stadium II-IV) oraz z ujemną ekspresją receptorów estrogenowych. Leki stosowane najczęściej w raku piersi to: antracykliny (doksorubicyna, epirubicyna), taksany (docetaksel, paklitaksel), cyklofosfamid, 5-fluorouracyl czy kapecytabina. Podawane są one cyklicznie w różnych zestawieniach tworząc programy wielolekowe np. CMF (cyklofosfamid + metotreksat + 5-fluorouracyl) lub 4AC/4T (doksorubicyna + cyclofosfamid + paklitaksel) [50].

1.5.3.2. Immunoterapia

Niekorzystne skutki chemioterapii, radioterapii oraz chirurgii zmuszają badaczy do opracowania alternatywnych strategii walki z rakiem. Odpowiedzią na te poszukiwania wydaje się być immunoterapia, która opiera się w szczególności na odporności komórkowej, oddziaływaniu antygen-przeciwciała oraz produkcji chemokin. Nadrzędnym celem immunoterapii nowotworów jest indukcja odpowiedzi immunologicznej pacjenta, w celu

zwiększenia populacji aktywowanych komórek odpornościowych posiadających zdolność rozpoznawania i niszczenia komórek nowotworowych [51]. Szerokie zrozumienie mechanizmów działania wrodzonych i nabytych komórek odpornościowych oraz ich cząsteczek czyni obecnie immunoterapię skutecznym i najbardziej obiecującym narzędziem w leczeniu raka.

Przykładem immunoterapii są szczepionki przeciwnowotworowe, których efektem działania jest indukowanie specyficznych dla nowotworu komórek efektorowych T, które mogą zmniejszać masę guza oraz indukować pamięć immunologiczną w celu kontrolowania nawrotów. Wiele cytokin, m.in. IFN- γ i IL-9, IL-2, hamuje wzrost guza poprzez spowalnianie proliferacji komórek, neoangiogenezy i aktywację wczesnych limfocytów T. Rozpoznawanie neoantygenów lub neoepitopów specyficznych zmian DNA lub odkrycie danej mutacji również przyczynia się do leczenia. Co więcej, molekularna identyfikacja antygenów specyficznych dla raka doprowadziła do opracowania immunoterapii specyficznej dla antygeny oraz znalezienie inhibitorowych punktów kontrolnych układu odpornościowego.

1.5.3.3. Hormonoterapia

W luminalnych nowotworach złośliwych gruczołu piersiowego wykazujących ekspresję receptorów estrogenowych (ER+) i/lub progesteronowych (PgR+) ekspozycja na poziom estrogenów we krwi jest istotnym czynnikiem wpływającym na ryzyko rozwoju raka. W ich leczeniu istotną rolę odgrywiają leki blokujące wydzielanie estrogenów lub blokujące receptor estrogenowy. Zazwyczaj stosowane są one w leczeniu uzupełniającym, ale również znajdują zastosowanie w leczeniu neoadiuwantowym i paliatywnym.

1.5.3.3.1. Inhibitory aromatazy (IA)

Obserwacje kliniczne wskazują, że jednym z najskuteczniejszych sposobów terapii nowotworów piersi estrogenozależnych jest drastyczne zmniejszenie poziomu estrogenów przez zahamowanie ich syntezy. W syntezie hormonu zasadniczą funkcję pełni aromataza, która przekształca androgeny w estrogeny w procesie zwanym aromatyzacją. Inhibitory aromatazy (IA) hamują aktywność enzymu, dzięki czemu zatrzymują syntezę estrogenów w jajnikach, tkance tłuszczowej i ogniskach endometriozy prowadząc do hipiestrogenizmu [52]. Leki te dzielą się na pochodne niesteroidowe, które odwracalnie hamują aktywność enzymu (tj. anastrozol i letrozol), oraz pochodne steroidowe (np. eksemestan), które nieodwracalnie hamują aktywność enzymu. Stosowane są w leczeniu hormonozależnych raków piersi i jajnika u

pacjentek pomenopauzalnych, u których większość estrogenów w organizmie jest wytwarzana w tkankach obwodowych [53]. Stosowanie IA u pacjentek przedmenopauzalnych w przypadkach nietolerancji tamoksyfenu (objawy niepożądane, zwiększone ryzyko zakrzepowosatorowe, depresja, alergia) wymaga wywołania farmakologicznej menopauzy za pomocą analogów gonadoliberyny, np. gosereliny. Głównym działaniem niepożądanym IA są zaburzenia kostno-stawowe tj. osteoporoza, bóle i zapalenia stawów.

1.5.3.3.2. Selektywne modulatory receptora estrogenowego (SERM)

Selektywne modulatory receptora estrogenowego (SERM) stanowią grupę związków, które działają agonistycznie lub antagonistycznie do estrogenów w zależności od rodzaju tkanki i typu receptora estrogenowego. Dzięki podobieństwom struktury rdzenia do cząsteczki 17 β -estradiolu, związki z rodziny SERM działają na wewnątrzkomórkowe receptory estrogenowe, a tym samym wywierają typowe dla określonego typu receptora efekty transkrypcyjne, m.in. wpływają na syntezę białek regulujących procesy proliferacji, różnicowania, migracji oraz potencjału przerzutowego komórek nowotworowych [54]. Wyróżniamy dwa podtypy receptora estrogenowego: ER α i ER β . Ekspresja obu receptorów może zmieniać się w tkankach podczas rozwoju, postępującego wieku i w następstwie różnych procesów patologicznych. Analiza dystrybucji receptorów estrogenowych w tkankach oraz szlaków sygnałowych z efektami transkrypcyjnymi wykazały, że ekspresja receptorów ER α i związane z nimi wzmocnienie czynnika transkrypcji AP-1 występuje w piersiach oraz żeńskich narządach rozrodczych. Ekspresję receptora ER β zanotowano głównie w komórkach śródbłonna naczyń, kości oraz komórkach gruczołu krokowego [55]. Zróżnicowane modulacyjne działanie SERM znalazło zastosowanie w terapii chorób związanych z regulacją estrogenową, w tym leczeniu niepłodności (zaburzeń owulacji), antykoncepcji, hormonoterapii zastępczej, profilaktyce i leczeniu osteoporozy pomenopauzalnej, leczeniu dyspareunii oraz przede wszystkim w leczeniu i zmniejszaniu ryzyka zachorowania na raka piersi. Spośród związków należących do rodziny SERM zastosowanie w praktyce klinicznej znalazły: afimoksyfen, arzoksyfen, bazedoksyfen, kломifen, lazoksyfen, ormeloksyfen, raloksyfen, tamoksyfen i toremifen [56]. Poszczególne leki z grupy SERM różnią się działaniem estrogenowym oraz antyestrogenowym w zależności od ich aktywności wewnętrznej i ekspresji ER w tkankach. Kломifen i tamoksyfen charakteryzują się zrównoważoną aktywnością estrogenową i antyestrogenową, natomiast raloksyfen wykazuje większy efekt antyestrogenowy niż tamoksyfen. W leczeniu i prewencji raka piersi największą skutecznością cechuje się tamoksyfen. W badaniu porównującym

tamoksyfen i raloksyfen (STAR; Study of Tamoxifen and Raloxifene) w zapobieganiu rozwojowi nieinwazyjnego raka piersi, raloksyfen w dobowej dawce 60 mg był w 78% tak samo skuteczny jak tamoksyfen w dawce 20 mg [57].

Tamoksyfen ((Z)-2-(4-(1,2-difenylobut-1-en-1-yl)fenoksy)-N,N-dimetyloetylo-1-amina) jest selektywnym modulatorem receptora estrogenowego stosowanym w leczeniu wczesnego oraz zaawansowanego raka piersi z dodatnią ekspresją receptorów estrogenowych u kobiet przed i postmenopauzalnych oraz u mężczyzn. Dodatkowo wykorzystywany jest w leczeniu przerzutowego raka piersi, raka przewodowego przedinwazyjnego, w leczeniu adjuwantowym oraz zmniejsza ryzyko zachorowania na raka piersi u kobiet z grupy wysokiego ryzyka [58]. Badania nad mechanizmami działania tamoksyfenu wykazały, że wyzwała on efekty estrogenne i antyestrogenne, a profil tego działania różni się w zależności od tkanki docelowej. Główne działanie antyestrogenowe tamoksyfenu opisano w tkankach gruczołu piersiowego, natomiast w macicy, wątrobie i kościach wykazuje on działanie estrogenowe. Efekty estrogenowe tamoksyfenu sugerują więc jego potencjał terapeutyczny w leczeniu zaburzeń gęstości kości i lipidów we krwi u kobiet po menopauzie. Ze względu na profil działania może on zwiększać ryzyko krwawienia pomenopauzalnego, polipów endometrium, przerostu i raka endometrium, udaru mózgu, problemów ze wzrokiem czy zatorowości płucnej. Dodatkowymi działaniami niepożądanymi są też nieregularne miesiączki, utrata wagi czy uderzenia gorąca [59].

Na szczególną uwagę zasługują właściwości antyestrogenowe tamoksyfenu. Badania nad właściwościami farmakologicznymi leku wykazały, że tamoksyfen jest niesteroidowym antagonistą kompetycyjnym i rywalizuje o miejsca wiązania w komórkach docelowych z endogennymi estrogenami. Wiążąc się z receptorami estrogenowymi w komórkach nowotworowych (ER+/ER dodatnich) i innych tkankach, tamoksyfen wytwarza kompleks jądrowy, który zmniejsza syntezę DNA i hamuje działanie estrogenów endogennych. Lek posiada stosunkowo niewielkie powinowactwo do samych receptorów estrogenowych, w przeciwieństwie do jego aktywnych metabolitów, takich jak endoksyfen (4-hydroksy-N-desmetylotamoksyfen) i afimoksyfen (4-hydroksytamoksyfen; 4-OHT), które charakteryzują się 30-100 razy większym powinowactwem [60,61]. W konsekwencji, tamoksyfen hamuje ekspresję genów regulowanych przez estrogen, w tym czynniki wzrostu i czynniki angiogenne wydzielane przez guza. Rolą tamoksyfenu jest zahamowanie faz cyklu komórkowego przez co komórki pozostają w fazie G0 i G1 w wyniku czego zmienia się równowaga między proliferacją komórek a ich trwającą utratą. Tamoksyfen wykazuje więc funkcję cystostatyczną zapobiegając dalszemu podziałowi komórek. Ponadto, wykazano również, że tamoksyfen może indukować

syntezę TGF- β w komórkach bez receptora estrogenowego poprzez indukcję syntezy TGF- β w strukturze mezenchymalnej raka piersi. Lek wykazuje więc parakryny i autokryny mechanizm działania niezależny od interakcji z receptorem estrogenowym. Dodatkowo może on obniżać stężenie we krwi insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-I) u pacjentów z rakiem piersi. IGF-I jest silnym mitogenem dla komórek raka piersi i może działać na drodze endokryny, parakryny i autokryny celem stymulowania wzrostu komórek nowotworowych [62]. Poza tym kompleks ER/tamoksyfen rekrutuje również inne białka - korepresory, hamując wydzielanie koaktywatorów takich jak p160, SRC-1, TIF2 lub GRIP-1 oraz AIB1 (określany również jako ACTR, RAC3, pCIP lub NCoA-3), acetylazy histonowe CBP, p300 oraz związany czynnik p300/CBP, pCAF. Tamoksyfen konkurując z estradiolem (E2) o wiązanie z receptorem estrogenowym, indukuje zmianę konformacyjną, w której rekrutacja koaktywatorów p160 jest zablokowana. Wiążąc się z DNA komórek moduluje ekspresję genów prowadząc do zaprogramowanej śmierci komórek. Aktywacja jądrowych korepresorów tj. N-CoR, SMRT dodatkowo wzmacnia ten proces zmniejszając ekspresję genów docelowych (down regulation). Kluczowym białkiem dla przeciwnowotworowego działania tamoksyfenu jest PAX2 (Paired box gene 2). Pax2 konkuruje z koaktywatorem ER AIB-1/SRC-3 o wiązanie i regulację transkrypcji ErbB2. Zmniejszona ekspresja/brak ekspresji PAX2 może tłumaczyć oporność komórek raka piersi na działanie tamoksyfenu [63]. Mimo tego, że od czasu jego wynalezienia tamoksyfenu minęło przeszło sześćdziesiąt lat, pełni on ważną rolę w leczeniu hormonozależnego raka piersi. Obserwacje kliniczne wskazują, że wydłużenie czasu przyjmowania leku w terapii adiuwantowej z 5 do 10 lat zmniejsza ryzyko wznowy choroby nowotworowej z 25,1% do 21,4%, natomiast ryzyko śmiertelności z powodu raka piersi spada analogicznie z 15% do 12,2% [64].

Poza bezpośrednim cytotoksycznym działaniem przeciwnowotworowym, tamoksyfen wpływa modulacyjnie na mikrośrodowisko guza. Składa się ono głównie z komórek T, komórek B, komórek dendrytycznych, makrofagów i neutrofilów. Tamoksyfen nie tylko odwraca przeciwzapalne działanie estrogenów, ale odgrywa znaczącą rolę w aktywacji komórek odpornościowych oraz wpływa na profil wydzielanych przez nie cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych.

W mikrośrodowisku guza tamoksyfen działa aktywująco na prozapalne szlaki sygnalizacyjne neutrofilów m.in. przez oddziaływanie z wewnątrzkomórkowymi ceramidami. W wyniku wpływu na kompleksy ceramid/PKC ζ następuje indukcja mechanizmów chemotaksji, fagocytozy oraz tworzenia pozakomórkowych pułapek neutrofilów (NET) [65].

W komórkach NK (Natural Killers) tamoksyfen zwiększa ekspresję c-erbB-2 w hormonozależnych rakach piersi wzmacniając ich działanie i prowadząc do lizy komórek nowotworowych przez cytotoksyczność zależną od przeciwciał (ADCC). Dodatkowo zwiększa on ekspresję międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej-1 (ICAM-1), która jest kluczowym czynnikiem łączącym i tworzącym synapsy immunologiczne między NK a komórkami docelowymi [66]. Antyestrogenowe działanie tamoksyfenu prowadzi do zwiększonej proliferacji efektorowych komórek T CD8⁺ oraz CD4⁺, przy jednoczesnym zmniejszeniu liczby komórek T regulatorowych oraz makrofagów fenotypu M2 w otoczeniu guza [67]. Stosowanie tamoksyfenu zwiększa ekspresję genów związanych z IFN w komórkach nabłonkowych gruczołu piersiowego, co sugeruje jego pozytywny wpływ na nadzór immunologiczny. Ponadto, tamoksyfen hamując aktywację JNK wzmacnia ekspresję TNF-R2 na aktywowanych limfocytach T i promuje ich proliferację [68].

1.5.4. Terapia celowana

Leki stosowane w ramach terapii celowanej hamują swoiste ścieżki przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych warunkujących rozwój nowotworu i związane z nim procesy naciekania, proliferacji, angiogenezy i powstawania przerzutów. Celem dla tej grupy leków są białka powierzchniowe lub cytoplazmatyczne, których ekspresja została określona w ramach profilowania molekularnego pacjenta i stanowi różnicę między komórką nowotworową a prawidłową. W nowotworach piersi terapie celowane wpływają dwa szlaki sygnałowe związane z receptorami dla naskórkowego i naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu. Należy wskazać, iż w ok. 20-30% przypadkach pacjentów z rakiem piersi występuje nadekspresja receptora HER2 na błonie komórek nowotworowych, która wiąże się z większym ryzykiem wznowy i gorszym rokowaniem [69]. Wysoka ekspresja HER2 często koreluje z opornością na chemioterapię i hormonoterapię [70]. Ten negatywny czynnik prognostyczny został zneutralizowany wraz z wprowadzeniem rekombinowanych humanizowanych przeciwciał monoklonalnych IgG1 (trastuzumab, pertuzumab). Przeciwciała te łącząc się specyficznym z epitopami receptora HER (trastuzumab w subdomenie IV domeny zewnątrzkomórkowej, pertuzumab w subdomenie II domeny zewnątrzkomórkowej) hamują nadmierną proliferację komórek, osłabiają proces angiogenezy, a także aktywują cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (ADCC, z ang. Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity) [71]. Wprowadzenie trastuzumabu zwiększyło 5-letni czas przeżycia wolny od choroby u pacjentów HER2⁺ w 1-3 stopniu zaawansowania do 87%, zaś wprowadzenie pertuzumabu zwiększyło wskaźnik całkowitej regresji guza (z 29 do 45,8%) [72,73].

1.6. Rola układu odpornościowego w kancerogenezie

Prawidłowo działający układ odpornościowy eliminuje uszkodzone lub zainfekowane komórki przez stymulację aktywności enzymów i ekspresję genów cytokin w otaczających komórkach. Cytokiny, wiążąc się ze specyficznymi receptorami zmieniają aktywność wewnątrzkomórkową szlaków sygnalizacyjnych i prowadzą do powstania miejscowego stanu zapalnego. Dzięki temu mechanizmowi dochodzi do eliminacji niepożądanych komórek, przywrócenia funkcji tkanki i odzyskania niezbędnej integralności strukturalnej [74].

Komórki nowotworowe mają trwałe (genetyczne) lub odwracalne (epigenetyczne) zmiany w swoim genomie, które częściowo hamują ich komunikację z otaczającymi komórkami oraz układem immunologicznym. Przekształcają one liczne ścieżki sygnałowe na takie, które w normalnych warunkach chronią prawidłową tkankę, stając się niewidocznymi dla komórek odpornościowych. Nowotwory złośliwe powstają więc w procesie ewolucyjnym, który nie jest jednorazową konsekwencją, ale wynikiem serii mechanizmów auto-nieregulowanych wewnątrzkomórkowych oraz międzykomórkowych (odpornościowych). Poza tym, nowotwory mają zdolność do angiogenezy, powstawania przerzutów, unikania apoptozy, stanów zapalnych, mechanizmów starzenia i ucieczki immunologicznej [75].

Rolą prawidłowo działającego układu odpornościowego powinna być likwidacja nowotworu i utrzymanie homeostazy. Sytuacja w środowisku nowotworowym wydaje się paradoksalna. Guz nie tylko tworzy swoistą tarczę dla siebie, ale także eksploatuje komórki układu odpornościowego prowadząc do powstania wokół siebie korzystnych warunków środowiskowych (np. przewlekły stan zapalny) umożliwiając angiogenezę, inwazję podścieliska, naczyń krwionośnych, chłonnych oraz prowokując wiele innych procesów wspierających ich wzrost. Tak więc oprócz immunosupresji ucieczka immunologiczna guza obejmuje również rekrutację komórek gospodarza, produkcję chemokin, tworząc mikrośrodowisko guza umożliwiające dalszą progresję [76].

NF- κ B to kompleks białkowy kontrolujący transkrypcję DNA, produkcję cytokin i przeżycie komórek. Znajduje się on w prawie wszystkich typach komórek zwierzęcych i bierze udział w odpowiedzi komórkowej na bodźce stresowe pełniąc istotną rolę w reakcji zapalnej [77]. NF- κ B aktywuje ekspresję wielu genów biorących udział w przejściu między stanem zapalnym a regeneracją. Zmieniona aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w komórkach nowotworowych powoduje zaburzenia regulacji wymiany sygnałów międzykomórkowych przez co nabywają one nowe uzupełniające się funkcje i określone pozycje. Brak tej wzajemnej regulacji między przeprogramowaniem genetycznym a interakcjami komórkowymi umożliwia komórkom rakowym powstawanie przerzutów. Komórki rakowe reagują wówczas

nieprawidłowo na cytokiny i aktywują kaskady sygnałów, które mogą chronić je przed układem odpornościowym. W konsekwencji, supresja NF- κ B ogranicza proliferację komórek rakowych [78,79].

1.6.1. Antygeny nowotworowe

Antygeny na powierzchni komórek nowotworowych powstają w wyniku mutacji lub translokacji prawidłowych genów (np. B-*kat*enina, CDK4, Ras), nadekspresji niektórych białek (p53, HER2) lub na drodze infekcji wirusowej (HPV –human papilloma virus, białka E6 and E7) [80]. Poprzez nieefektywną stymulację, wrodzonych/adaptacyjnych zaburzeń odpowiedzi immunologicznych lub tolerancji antygeny dochodzi do zjawiska „ucieczki” przed komórkami odpornościowymi gospodarza. Nierozpoznawanie antygenów przez układ HLA (human leukocyte antigens) jest jednym z głównych mechanizmów promujących wzrost guza oraz umożliwiających wytwarzanie przerzutów [81]. Ponadto, mutacje antygenów nowotworowych przyczyniają się do ucieczki przed początkową reakcją immunologiczną oraz zwiększają niejednorodność nowotworów. Heterogenność nowotworowa utrudnia z kolei ustanowienie skutecznej swoistej odpowiedzi immunologicznej. Nowotwory na ogół wykazują „regulację w dół” układu MHC-1, co znacznie utrudnia odpowiedź immunologiczną za pośrednictwem limfocytów T, podczas gdy pozytywna ekspresja mniej polimorficznych HLA-E zapewnia z kolei ochronę przed komórkami NK. Mutacja podjednostki β -2 mikroglobuliny lub transportera związanego z przetwarzaniem antygeny białka TAP może zmniejszać ekspresję MHC-1, co w konsekwencji może zapobiegać dalszemu rozpoznaniu guza przez komórki NK [82].

1.6.2. Odpowiedź immunologiczna podczas kancerogenezy

Wrodzone i adaptacyjne szlaki immunologiczne organizmu przenikają się i wykazują nadzór immunologiczny nad komórkami rakowymi. W samym zrębie guza oraz w jego otoczeniu również występuje kilka rodzajów komórek odpornościowych. Makrofagi, neutrofile, komórki dendrytyczne i inne komórki odporności wrodzonej są głównymi składnikami leukocytnego nacieku nowotworowego. Pobudzenie głównej wrodzonej odporności do wykrywania antygenów w rosnących nowotworach i limfocytach T odbywa się poprzez produkcję IFN typu 1. Powoduje ona bezpośrednio zabijanie komórek nowotworowych, niszczenie naczyń nowotworowych, macierzy nowotworowej oraz hamuje angiogenezę [83]. Głównym składnikiem odpowiedzi adaptacyjnej (nabytej) są limfocyty B i T. Ostra aktywacja limfocytów B bierze udział w eliminacji wczesnych komórek nowotworowych poprzez klasyczne i dobrze zbadane mechanizmy przy udziale przeciwciał. Przewlekła aktywacja

limfocytów B może sprzyjać rozwojowi raka w sposób złożony. Zbyt słabo wygenerowana odpowiedź może okazać się niewystarczająca albo prowadzić do tolerancji. Nabyte odpowiedzi immunologiczne mogą również powodować: ciągłą i nadmierną aktywację układu wrodzonego, odkładanie się przeciwciał w tkankach powodując rekrutację wrodzonych komórek odpornościowych oraz dysfunkcję limfocytów T zamiast ich aktywacji. Populację komórek gospodarza, które uczestniczą w mechanizmie ucieczki immunologicznej nowotworu tworzą m.in. regulatorowe komórki dendrytyczne, limfocyty T regulatorowe (Treg) i podtypy komórek supresorowych pochodzenia szpikowego (MDSC), które wydzielają czynniki prozapalne wspierające angiogenezę, inwazję nowotworową i tworzenie przerzutów [84].

1.6.2.1. Komórki NK

Komórki Natural Killer (urodzeni zabójcy) są limfocytami cytotoksycznymi i stanowią istotną część odporności wrodzonej. Ich wyjątkowość polega na tym, że w odróżnieniu od typowej komórki odpornościowej, potrafią wykryć zakażone komórki bez konieczności stosowania przeciwciał lub MHC. Aktywowane przez interleukinę 2 (IL-2), komórki NK zapewniają szybką odpowiedź w przypadku infekcji wirusowej komórki lub procesu nowotworowego.

Należy podkreślić, że komórki NK są elementem odpowiedzi komórkowej organizmu skierowanej przeciw rozprzestrzenianiu się przerzutów krwiopochodnych i powstawaniu tkanek litych [85]. Proapoptotyczne działanie komórek NK opiera się na mechanizmach zależnych od białek TRAIL i ich ligandów w komórkach docelowych a także receptorach NKG2D i ich białkowych ligandów z układu MHC-1 ekspresowanych na komórkach nowotworowych. Komórki rakowe zabijane są wówczas przez uwalnianie perforyny, granzymów, chemokin (IFN γ , TNF α i GM-CSF) lub przez aktywację adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej w wyniku ekspresji KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors). Na przykład IFN- γ (interferon- γ) przyczynia się do kontroli przeciwnowotworowej bezpośrednio poprzez hamowanie proliferacji i powstawania przerzutów oraz pośrednio poprzez indukowanie czynników antyangiogennych, np. IL-12, wzmacniając tym samym ich cytotoksyczność. Dodatkowo komórki NK mają zdolność rekrutacji komórek dendrytycznych i uruchamiania odpowiedzi limfocytów T efektorowych [86].

Pomimo wszystkich tych mechanizmów prowadzących do zabicia komórki nowotworowej, mutacje w komórkach rakowych pomagają im unikać nadzoru komórek NK. Dzieje się tak przez regulację w dół podjednostek β -2m, LMP-2 i LMP-7 (polipeptydy o niskiej masie cząsteczkowej), co modyfikuje widmo peptydowe cząsteczki MHC-1. Białko zaangażowane w

wiązanie peptydu antygenowego na MHC-1 jest wówczas transporterem związanym z przetwarzaniem antygeny TAP. Często białko związane z TAP - Tapasin jest również zmutowane lub jego ilość jest zmniejszona w guzach. Niedobór TAP skutkuje utratą ekspresji MHC-1 i wzrostem karcynogenezy. W rezultacie, zmiana ekspresji MHC-1 umożliwia skuteczną ucieczkę przed lizą guza za pośrednictwem komórek NK [87]. Jest to proces interesujący szczególnie w kontekście przyjętej teorii „nieciągłości odporności” zgodnie z którą, komórki NK mają zdolność odróżniania swoich komórek od obcych. Mimo to mechanizm ciągłej ekspozycji zmienionych antygenów własnych oraz guza sprawia, że odpowiedź immunologiczna jest anergiczną.

Podczas rozwoju komórki nowotworowej, komórki NK zwykle napędzają makrofagi/komórki T w celu uzyskania aktywności przeciwnowotworowej. Po wykonaniu tej czynności nie wykazują już interakcji z innymi komórkami NK i paradoksalnie część z nich może działać promująco na nowotwór. Co więcej, w przypadku niektórych nowotworów komórki tracą MHC na swojej powierzchni oraz uwalniają chemokiny (np. TGF- β), które dodatkowo mogą hamować aktywność komórek NK.

Aktywność komórek NK w sąsiedztwie guza jest zmniejszana przez supresory wytwarzane przez komórki nowotworowe. Uwalniają one bowiem czynniki, które odpowiadają za anergię komórek NK, a mianowicie: kortykosteroidy, 2,3-dioksygenazę indoloaminy (IDO) i prostaglandynę E2 (PGE-2). Wpływają one na system receptorów NKG2, czego konsekwencją może być zmniejszenie cytotoksyczności komórek i hamowanie ich migracji.

Kolejną charakterystyczną cechą mikrośrodowiska guza jest niedotlenienie. Przyczynia się ono m.in. do unikania cytotoksyczności zależnej od komórek NK głównie poprzez obniżenie poziomu niektórych cytokin, w tym IL-2, IL-15, IL-12 i IL-21, które indukują aktywację receptorów komórek NK (NKp46, NKp30, NKp44 i NKG2D) oraz wewnątrzkomórkowy poziom perforyny i granzymu B. Niedotlenienie nie wpływa jednak na ligandy komórek NK (HLA-ABC i -E, MICA/B i ULBP1-2) oraz receptory KIR, NKG2A/C, cząsteczki pomocnicze DNAX-1 (DNAM-1), naturalne receptory cytotoksyczności (NCR), i 2B4 [76]. W warunkach niedotlenienia rekrutowane komórki Treg wytwarzają TGF- β odpowiedzialny za anergię komórki NK. Ponadto, stres związany z niedotlenieniem może wywoływać tworzenie się dimerów nieklasycznych cząsteczek MHC klasy I HLA-G na powierzchni komórek, co zwiększa ochronę komórek nowotworowych przed zabijaniem za pośrednictwem NK. Proces ten inicjuje pośrednio wydzielanie IFN- β i IFN- γ oraz bezpośrednie oddziaływanie HLA-G z komórkami NK [88].

1.6.2.2. Makrofagi

Makrofagi związane z nowotworem (TAM) reprezentują jeden z głównych typów komórek odpornościowych naciekających nowotwór i są podzielone na dwa funkcjonalnie kontrastujące podtypy: makrofagi M1 i M2. Makrofagi charakteryzują się dużą plastycznością genomu i zmiennością zgodnie z panującymi warunkami mikrośrodowiska. Makrofagi wywodzą się z linii pochodzącej z monocytów i wykazują cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (ADCC). Podczas reakcji immunologicznej makrofagi wydzielają szereg czynników cytotoksycznych, takich jak reaktywne formy tlenu (ROS) i reaktywne formy azotu (RNS) i czynniki martwicy nowotworu (TNF) [89]. W procesie nowotworowym, makrofagi M1 są efektorami prozapalnymi odpowiedzi immunologicznej i stymulują odpowiedź typu Th1. Makrofagi fenotypu M2 określa się jako makrofagi związane z procesem nowotworowym, a badania nad ich aktywnością immunologiczną wykazały, że mają charakter przeciwzapalny. Mogą one jednak hamować proliferację guza poprzez uwalnianie cytotoksyn (ROS), enzymów (proteazy serynowe), czynników lizy komórek, a także angażowanie komórek T przez przetwarzanie i prezentację antygenów guza [90]. Wykazano, że hamowanie IKK- β (inhibitor Nuclear Factor Kappa-B Kinase podjednostka beta) w TAM kieruje polaryzacją makrofagów M2 do fenotypów M1, które aktywnie zabijają komórki nowotworowe [91, 92, 93]. W przeciwieństwie do makrofagów M1, makrofagi M2 nie mają działania cytotoksycznego i promują kancerogenezę poprzez wytwarzanie IL-10 i TGF- β . Dodatkowo zwiększają działanie czynnika wzrostu śródbłonnka naczyniowego (VEGF), metaloproteinazy macierzy (MMP) oraz osteopontyny. Ponadto, komórki z fenotypem M2 hamują aktywację i proliferację komórek T przez uwalnianie prostaglandyn, IL-10, TGF- β i IDO. W ten sposób, nie mogąc wywołać odpowiedzi typu Th1, Treg są stymulowane przez produkcję CCL22 do dalszego hamowania komórek efektorowych T [94]. Również aktywność proteazy katepsyny wywołana przez IL-4 w makrofagach promuje wzrost i inwazję raka. Ich produkcję wspierają niektóre interleukiny, np: IL-4, IL-13 i IL-10. Interleukina 4 wytwarzana jest przez naciekające nowotwór komórki CD25⁺ Th2 i powoduje przejście TAM w populację sprzyjającą przerzutom, wytwarzając tym samym wysoki poziom naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) [95]. Makrofagi M2 sprzyjają przerzutom przez białko chemotaktyczne monocytów MCP-1, które bierze udział w patogenezie wielu chorób autoimmunologicznych, metabolicznych i sercowo-naczyniowych [96]. Ponadto, białko MCP-1 jest wydzielane przez szereg typów komórek w mikrośrodowisku guza, takich jak fibroblasty, monocyty naciekające nowotwór, komórki śródbłonnka i adipocyty związane z nowotworem. Ekspresja tego białka w mikrośrodowisku guza promuje rozwój nowotworu, sprzyjając angiogenezie, przerzutowości oraz zwiększa napływ komórek

odpornościowych. Działa poprzez indukcję transdukcji sygnału i rekrutację monocytów w ognisku zapalnym. Monocyty, ulegając transformacji do makrofagów wydzielają aktywator plazminogenu typu urokinazy (uPAR) i MMP-9, które mają zdolność do remodelowania mikrośrodowiska guza [97]. Wydzielanie MCP-1 przez komórki nowotworowe oraz dalsza aktywacja makrofagów zapowiada gorsze rokowanie, jak i zwiększa przerzutowość w guzach litych (np. niedrobnokomórkowym raku płuc (NSCLC), raku prostaty, raku piersi, raku jajnika i raku wątrobowokomórkowy [98,99,100]. W mysim modelu raka wątrobowokomórkowego wykazano, że MCP-1 zmienia stężenia IL-6 i TNF- α , wpływając na dalsze onkogenne szlaki sygnałowe [101]. TAM znajdują się w zrębie wielu nowotworów i mogą wpływać na biologię tkanki nowotworowej. Działają one głównie jako mediatory stanu zapalnego, zaś przewlekły stan zapalny jest jedną z dominujących cech raka. Łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF) uwalniany podczas przewlekłego zapalenia w guzie wspiera przeżywalność TAM. W konsekwencji, wyższy profil TAM i ich czynników stymulujących (tj. chemokiny i cytokiny: CSF-1, CCL2, IL-10, TGF- β) wiąże się z gorszym rokowaniem i zwiększoną częstością występowania raka, w szczególności nowotworu pęcherza moczowego, piersi i szyjki macicy [102]. Obecność TAM w pobliżu naczyń krwionośnych jest znacząca dla postępu choroby nowotworowej, a wynacznienie komórek nowotworowych następuje w sąsiedztwie makrofagów. Większa liczba makrofagów wewnątrz guza odpowiada wyższej gęstości naczyń krwionośnych i progresji guza. W rezultacie, TAM są nie tylko rakotwórcze, ale umożliwiają wręcz modulację reakcji guza na leki przeciwnowotworowe, zaś o oporności na leki rozstrzygają synergistyczne efekty MFG-8 i IL-6 wydzielane właśnie przez TAM [103]. Podsumowując, zmienność fenotypów makrofagów jest jedną z głównych przyczyn adaptacji komórek nowotworowych przez układ odpornościowy.

1.6.2.3. Neutrofile

Podobnie jak makrofagi, neutrofile wykazują dużą plastyczność w warunkach patofizjologicznych i mogą mieć różne profile fenotypowe i funkcjonalne. Neutrofile regulują funkcje wrodzonego i nabytego układu odpornościowego poprzez uwalnianie różnych cytokin i cząsteczek efektorowych.

Środowisko stanu zapalnego jest odpowiedzialne za generowanie nowych receptorów chemokin na infiltrujących neutrofilach, co upośledza funkcjonalną odpowiedź otoczenia na chemokiny (takie jak CCR7, CXCR3 i CXCR4) czy zwiększa poziom CCR 5. Neutrofile można podzielić na 2 rodzaje. Neutrofile TEN - tumor entrained neutrophils (neutrofile wprowadzone do guza) wykazujące właściwości przeciwnowotworowe, oraz neutrofile TAN - tumor-

associated neutrophils (neutrofile związane z guzem) wywierające w tym samym mikrośrodowisku działanie pronowotworowe poprzez tłumienie odpowiedzi immunologicznych i promowanie angiogenezy [104,105].

We wczesnych guzach fenotyp N1 populacji TEN jest bardziej cytotoksyczny w stosunku do nowotworów, które wydzielają znacznie wyższe poziomy TNF- α , NO i H₂O₂. Neutrofile aktywują komórki T i wykazują właściwości przeciwnowotworowe poprzez wydzielanie CCL2. Komórki populacji TAN uczestniczą w przebudowie macierzy pozakomórkowej (ECM), inwazji komórek nowotworowych, przerzutach, proliferacji i angiogenezy limfy oraz hamują przeciwnowotworowy nadzór immunologiczny. Naciekające TAN są modulowane przez TGF- β w celu uzyskania fenotypu pronowotworowego N2, a hamowanie TGF- β indukuje przeciwnowotworowy fenotyp N1 [106]. TAN powodują również rozwój guza poprzez MMP-9, CXCL1, TNF α , czynniki wzrostu FGF, HGF, EGF, a także angiogenezę za pośrednictwem VEGF. Dodatkowo wydzielane chemokiny IL-8/CXCL8, MIP-1/CCL3, HGCP-2 (hu GCP-2/CXCL6), IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10 i IL-12 również sprzyjają zwiększonej przeżywalności i rekrutacji neutrofilii N2. Dzieje się tak, ponieważ przerzutowe limfocyty Th17 naciekające pierwotny nowotwór rekrutują komórki N2 przez podnoszenie poziomu cytokin IL-17 w mikrośrodowisku raka, pogłębiając tym samym negatywną rolę w ucieczce immunologicznej nowotworu [107].

1.6.2.4. Komórki dendrytyczne

Komórki dendrytyczne są głównymi źródłami cytokin, zwłaszcza interleukina 12 (IL-12) i interleukina 3 (IL-3), które odpowiadają zarówno za odporność wrodzoną i nabytą oraz faworyzują odpowiedź immunologiczną typu Th1 w odrzucaniu komórek nowotworu. Odpowiadają za prezentację antygenów limfocytom T, a ich działanie ogranicza się do MHC-1 i MHC-2 [108].

Wydzielana przez komórki dendrytyczne gospodarza IL-12 zwiększa aktywność limfocytów CD8(+), które z kolei wytwarzają interleukinę 17 (IL-17). Proces ten przekłada się na aktywność przeciwnowotworową [109]. W obecności IFN- α dojrzałe komórki dendrytyczne mają zdolność rozpoznawczą co oznacza, że działają jak limfocyty T. Komórki dendrytyczne naciekające nowotwór (TIDC) wyzwalają produkcję TGF- β , która bierze udział w usuwaniu guzów poprzez sygnalizację za pośrednictwem limfocytów T. W niektórych przypadkach TIDC nie prezentują we właściwy sposób antygenów nowotworowych limfocytom T a nawet mogą hamować odpowiedź prozapalną poprzez stymulację zapalnych komórek TH2.

Z kolei, prostaglandyna 2 (PGE-2) stymuluje leukocyty oraz komórki guza do produkcji IL-10, co hamuje rekrutację i nagromadzenie komórek dendrytycznych. Zarówno PGE-2, jak i IL-10 dodatkowo zmniejszają wydzielanie IL-12 przez komórki dendrytyczne, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia odpowiedzi immunologicznej [110]. W rezultacie, poprzez limfocyty Treg nowotwór zmniejsza aktywację komórek dendrytycznych, co przyczynia się do dalszej immunosupresji a także wpływa na interakcję z komórkami efektorowymi T. Dodatkowo, regulatorowe komórki dendrytyczne mogą również wywołać tolerancję antygenową i supresję immunologiczną limfocytów T CD25+ poprzez szlak sygnalizacyjny receptora B7.

1.6.2.5. Limfocyty T

Limfocyty T, podobnie jak inne komórki odpornościowe, wykazują zmienioną rolę w mikrośrodowisku guza. Posiadają zarówno funkcje koordynujące jak i efektorowe w zakresie odporności immunologicznej. W zależności od kontekstu immunologicznego, limfocyty T nabywając fenotypy funkcjonalne i efektorowe, mają bezpośrednie działanie na aktywację procesów zapalnych lub przeciwzapalnych. Z tej też przyczyny występują jako druga, zaraz po makrofagach, najliczniejsza grupa komórek w mikrośrodowisku guza [111]. Ich obecność wykazano zarówno w niedotlenionej części rdzeniowej guza, jak też i wykraczających poza inwazyjną komponentę guza tkankach prawidłowych. Poza otoczeniem guza ich główna działalność przeciwnowotworowa odbywa się w węzłach chłonnych. Udowodniono, że wysoki poziom naciekania limfocytów T w nowotworach wiąże się z korzystniejszym rokowaniem w leczeniu czerniaka, raka piersi, płuca, jajników, jelita grubego, nerek, prostaty i żołądka [112,113,114,115]. Należy zaznaczyć jednak, że z uwagi na brak antygenów MHC-II w komórkach nowotworowych, za kluczowy składnik przeciwnowotworowy uważane są limfocyty Tc. Komórki Tc powstają po pobudzeniu i aktywacji limfocytów T CD8+ przez APC i wywierają skuteczny atak cytotoksyczny powodując bezpośrednie zniszczenie komórek docelowych. Odpowiedź przeciwnowotworowa, polega na wydzielaniu dużych ilości cytokin prozapalnych, takich jak IL-2, TNF- α i IFN- γ , białka chemotaktycznego monocytów (MCP-1), CCL-2 i białka zapalnego makrofagów (MIP- 1 α) [116].

Oprócz migracji do mikrośrodowiska guza komórki T powodują aktywację i wzrost cytotoksyczności komórek NK, ale także wpływają na wzrost prezentacji antygenów nowotworowych. Wobec powyższego stwierdzić należy, że obecność limfocytów T CD8+ i cytokin Th1 w guzach koreluje z korzystnym rokowaniem w zakresie przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od choroby w wielu nowotworach. Tym niemniej, guz nowotworowy ma zdolność indukcyjną rekrutacji limfocytów Treg, które przeciwdziałają

przeciwnowotworowym komórkom odpornościowym. W ten sposób limfocyty Treg poprzez wydzielanie hamujących cytokin TGF- β , IL-10 i IL-35, działanie supresyjne na receptory błonowe CTLA-4 i LAG-3, szlaki sygnalizacyjne zależne od NF- κ B i kinaz MAP oraz bezpośrednią listę komórek efektorowych promują rozwój i utrzymanie tolerancji immunologicznej [117,118]. W konsekwencji obecność limfocytów Treg będzie więc wiązać się z gorszym rokowaniem.

1.7. Receptory Siglec

Badania ostatnich lat wskazują, że procesy rozpoznania biologicznego na poziomie komórkowym i molekularnym są podstawą interakcji między nowotworem a układem odpornościowym. Zmieniona ekspresja genów i pokrewnych białek w procesie nowotworowym upośledza mechanizmy homeostazy immunologicznej i osłabia funkcję immunologiczną mikrośrodowiska guza. Nieprawidłowa glikozylacja powierzchni komórki jest kluczowym regulatorem immunogenności nowotworu i powoduje unikanie skutecznego nadzoru immunologicznego, a zmiany sialilacji błonowego glikokaliksu komórek nowotworowych jest jednym z głównych mechanizmów regulujących procesy proliferacji, migracji i przerzutowania komórek nowotworowych [119].

Homeostaza immunologiczna jest kontrolowana przez receptory i związane z nimi szlaki sygnałowe prowadzące do supresji lub aktywacji komórek układu odpornościowego [120]. Równowaga między hamującymi i aktywującymi mechanizmami kontroli immunologicznej ma szczególne znaczenie w procesach autoimmunologicznych a także nadzoru nad patogenami i komórkami nowotworowymi [121]. Spośród opisanych systemów kontroli immunologicznej, tzw. immune checkpoint, na szczególną uwagę zasługują immunoreceptory Siglec, które regulują aktywność komórek układu odpornościowego przez system sygnalizacji wewnątrzkomórkowej wzbudzonej po przyłączeniu sjalowanych ligandów. W przebiegu nowotworów słaby nadzór immunologiczny koreluje ze zwiększonym poziomem sialilacji błonowych glikoprotein i glikolipidów w komórkach nowotworowych.

1.7.1. Definicja i nazewnictwo

Struktury cukrowe glikoprotein i glikolipidów są swoiście rozpoznawane i wiązane przez receptory z grupy lektyn. Na podstawie analizy struktury i składu łańcuchów cukrowych wyszczególniono typy lektyn rozpoznające glikany zakończone mannozą, fukozą, galaktozą lub N-acetyloglukozaminą. Na szczególną uwagę zasługują glikoproteiny i glikolipidy, w których modyfikacje potranslacyjne skutkują przyłączeniem łańcuchów cukrowych

zakończonych kwasem sjałowym [122]. Główną podgrupą lektyn z domeną typu I zawierających w swojej budowie N-kończącą domenę immunoglobulinową V i wiążącą kwas sjałowy są receptory Siglec (z ang. Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins). Receptory Siglec, jako białka transbłonowe, charakteryzują się istotnym podobieństwem w zewnątrzkomórkowych aminowych sekwencjach N-końcowych oraz wewnątrzkomórkowych karboksylowych sekwencjach C-końcowych oraz zdolnością do rozpoznawania sjałowanych glikanów za pośrednictwem N-końcowej domeny immunoglobulinowej V (domena IgV) [123]. Podstawą interakcji receptora Siglec z kwasem sjałowym jest reakcja między resztą argininową (Arg) receptora a grupą karboksylową kwasu sjałowego [124,125]. Analiza struktury i funkcji receptorów Siglec wykazała, że poszczególne białka Siglec charakteryzują się swoistością rozpoznawania i wiązania kwasów sjałowych w zależności od ich umiejscowienia w łańcuchu cukrowym oraz sposobem łączenia wiązaniem α 2-3-; α 2-6- i α 2-8-glikozydowym w łańcuchu cukrowym [126].

Dotychczas opisano 17 receptorów Siglec, spośród których 15 występuje u człowieka. W przypadku trzech receptorów z rodziny Siglec, w genomie człowieka opisano tzw. allele zerowe, których obecność wyklucza powstanie produktu wiążącego kwasy sjałowe. Ponadto, analiza strukturalna wykazała, że 9 receptorów występujących u człowieka wykazuje homologię z receptorami mysimi [127]. Nazewnictwo poszczególnych receptorów Siglec wynika z kolejności ich odkrycia. Pierwszą odkrytą lektyną wiążącą kwas sjałowy była sjałoadhezyna (Sn), której nadano oznaczenie Siglec-1. Białka immunoglobulinopodobne CD22 i CD33 nazwano odpowiednio Siglec-2 oraz Siglec-3. Glikoproteiny wiążące mielinę u ssaków i ptaków (MAG – Mammalian myelin-associated glycoprotein oraz SMP - Schwann cell myelin protein) ze względu na podobieństwa funkcjonalne i strukturalne zgrupowano razem jako Siglec 4a oraz Siglec 4b [128]. Ludzkie receptory Siglec oznaczane są numerycznie, a receptory pozostałych ssaków oznaczono alfabetycznie bądź systemem rzymskim.

1.7.2. Podział receptorów z rodziny Siglec

Spośród opisanych receptorów Siglec, tylko cztery występują powszechnie w komórkach wszystkich ssaków w niezmięnionej formie, m.in.: sjałoadhezyna (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), glikoproteina związana z mieliną (MAG; Siglec-4) i Siglec-15. Pomimo dużej różnorodności (jedynie 25-30% identycznych sekwencji) cechują się one taką samą ewolucyjnie zachowaną podgrupą występującą u wszystkich ssaków. Drugą grupą są receptory Siglec spokrewnione z CD33, które charakteryzują się dużym podobieństwem (50-99%), ale na skutek ewolucji,

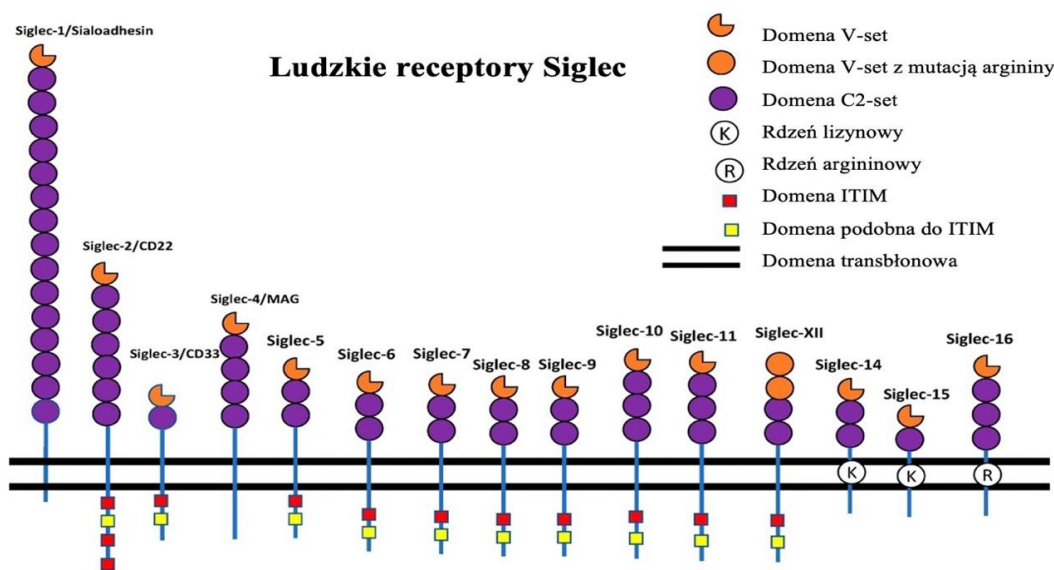
duplikacji i/lub konwersji genów, utrata egzonów w „konserwatywnych” receptorach Siglec doprowadziła do powstania istotnych różnic u różnych gatunków ssaków [129].

Ludzkie receptory Siglec są obecne na komórkach odpornościowych i mają domenę zewnątrzkomórkową podobną do Ig (Rycina 5). W strukturze ludzkich receptorów wyróżnić można jedną zewnątrzkomórkową domenę V, która wiąże się z ligandami kwasu sjałowego. Pod domeną V-set receptory te niosą różną liczbę domen C2. Siglec-3 i Siglec-15 mają tylko jedną domenę zestawu C2, podczas gdy Siglec-1 ma 16 domen zestawu C2. Jako wyjątek, Siglec-XII ma dwie domeny V, ale obie nie mają reszty argininowej i nie wiążą się z ligandem kwasu sjałowego. Większość receptorów Siglec ma domenę wewnątrzkomórkową ITIM i ITIM-podobną, która pośredniczy w transmisji sygnału hamującego do komórek. Receptory Siglec-14, -15 i -16 mają dodatkowo naładowaną resztę w domenie transbłonowej, która rekrutuje białko adaptorowe DAP12 i ułatwia aktywację sygnału do komórek.

Tabela 4. Podział, dystrybucja i rola receptorów z rodziny Siglec [130].

Rodzina	Typ	Dystrybucja	Udział
„konserwatywne” receptory Siglec	Siglec-1 (Sjaloadhezyzna)	makrofagi, monocyty, komórki dendrytyczne	choroby nowotworowe, infekcje
	Siglec-2 (CD 22)	limfocyty B	cukrzyca t.1, sepsa, SLE
	Siglec-4 (MAG)	komórki produkujące mielinę	neuropatia, schizofrenia,
	Siglec-15 (CD33L3)	osteoklasty, makrofagi, komórki dendrytyczne (DC)	choroby nowotworowe, osteoporoza
receptory Siglec spokrewnione z CD33	Siglec-3	komórki mieloidalne (monocyty, makrofagi, mikroglej)	schorzenia mielodysplastyczne
	Siglec- 5 (CD170)	monocyty, neutrofile	choroby nowotworowe
	Siglec-6 (CD327)	komórki trofoblastu, mastocyty, DC	alergie, zaburzenia trofoblastu
	Siglec-7 (CD328)	komórki NK, monocyty, mastocyty basofile	choroba Alzheimerera, choroby nowotworowe
	Siglec-8	eozynofile, mastocyty, basofile	alergie
	Siglec-9 (CD329)	komórki NK, monocyty, makrofagi, DC	choroby nowotworowe, astma, POChP
	Siglec-10 (SG2)	limfocyty B, NK, monocyty, DC	choroby nowotworowe, sepsa HCC
	Siglec-11	makrofagi, mikroglej, limfocyty B	choroba Alzheimerera, ostry uraz tkanek
	Siglec-XII	makrofagi, komórki nabłonka	choroby nowotworowe
	Siglec-14	monocyty, neutrofile	SLE, POChP, infekcja GBS

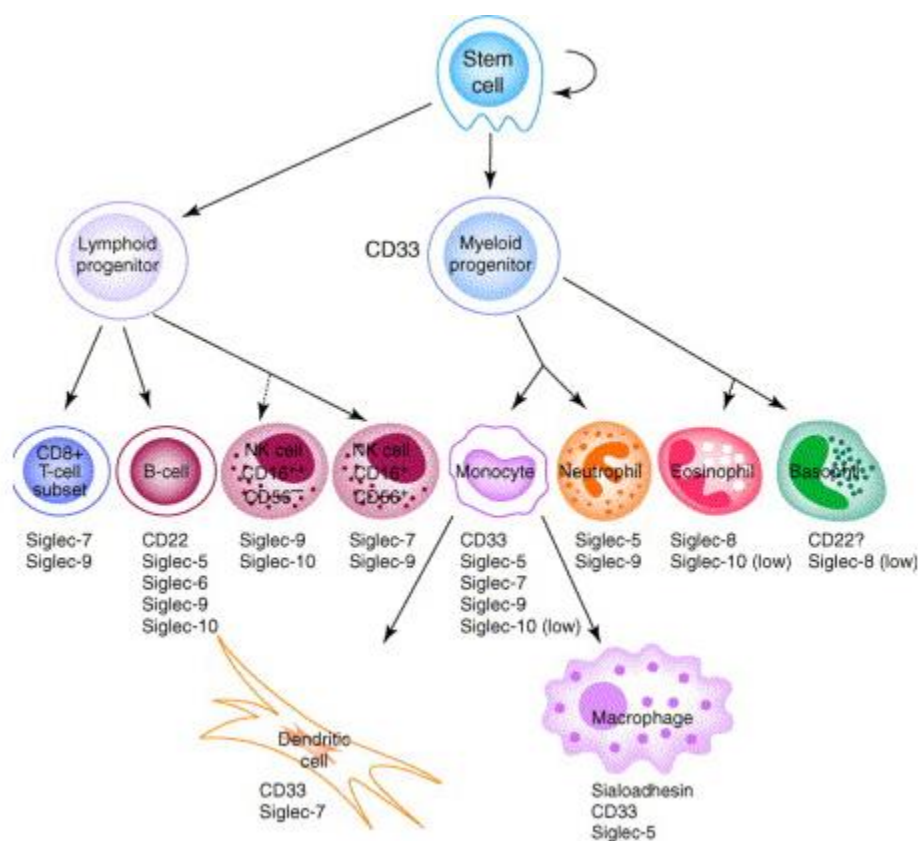
	Siglec-16	makrofagi, mikroglej	schizofrenia
--	-----------	----------------------	--------------



Rycina 5. Rodzina receptorów Siglec występujących u człowieka, wg. Siddiqui i wsp., w modyfikacji własnej [131].

1.7.3. Ekspresja receptorowa

Ekspresja receptorów Siglec jest wyrażana w sposób specyficzny dla typu komórek, co może sugerować ich zaangażowanie w funkcje poszczególnych populacji. Badania nad dystrybucją receptorów wykazały, że ich ekspresja zlokalizowana jest głównie w komórkach układu krwiotwórczego i odpornościowego (Rycina 6). Ekspresja niektórych receptorów Siglec jest powiązana z konkretnym typem komórek. Wykazano, że rola i ekspresja „konserwatywnych” receptorów Siglec-1, Siglec-2 i Siglec-4 w makrofagach, limfocytach B i komórkach glejowych jest podobna u wszystkich ssaków. Specyficzność komórkowa ludzkich i mysich receptorów Siglec spokrewnionych z CD33 często nie jest zgodna z ich relacjami ortologicznymi. Przykładem jest ludzki Siglec-3, którego ekspresję zanotowano w dojrzałych monocytach, podczas gdy jego mysie ortolog jest silnie ekspresjonowany tylko w granulocytach [132].



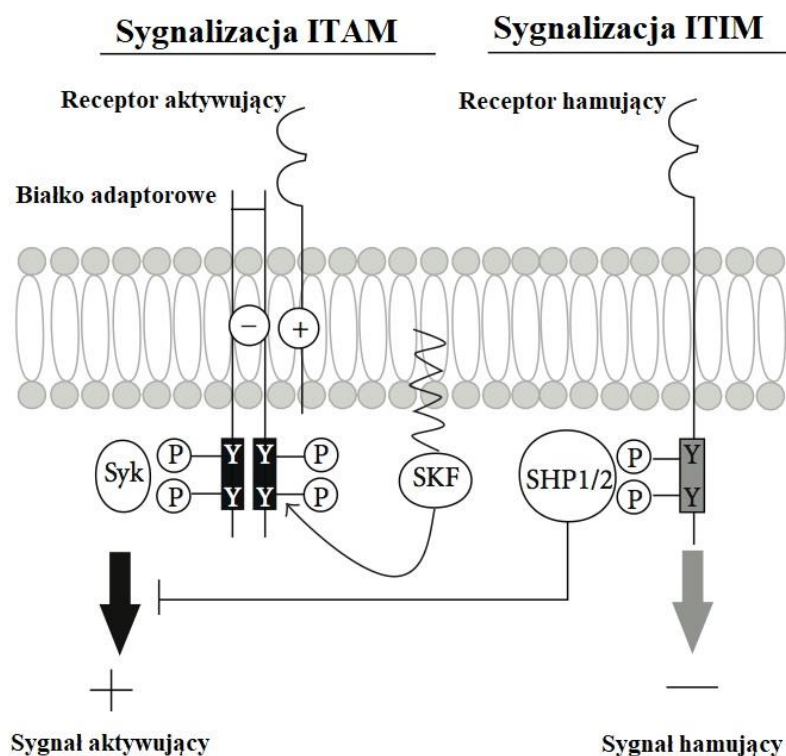
Rycina 6. Ekspresja receptorów Siglec w układzie krwiotwórczym człowieka; według Crocker i Varki 2001; w modyfikacji własnej. Objasnienia: stem cell-komórka macierzysta; lymphoid progenitor-komórka progenitorowa limfatyczna; myeloid progenitor-komórka progenitorowa mieloidalna; CD8+ T-cell subset-podzbiór komórek T CD8-pozytywnych; B-cell-komórka B; NK cell – komórka NK; monocyte-monocyt; neutrophil-neutrofil; eosinophil-eozynofil; basophil-bazofil

Ponadto, receptory Siglec spokrewnione z CD33 są różnorodnie ekspresjonowane w poszczególnych typach komórek w układzie odpornościowym, ze znacznym nakładaniem się ekspresji w poszczególnych populacjach. Szczególnie wysoki poziom ekspresji niektórych receptorów wykazano w poszczególnych typach leukocytów. Krążące monocyty wykazują wysoki poziom ekspresji receptorów Siglec-3, Siglec-5, Siglec-7 i Siglec-9, która pozostaje niezmienną po różnicowaniu się tych komórek w makrofagi lub w czasie stymulacji lipopolisacharydem (LPS) [133]. Dla porównania, pochodzące z monocytów komórki dendrytyczne zmniejszają ekspresję Siglec-7 i -9 po ekspozycji na LPS, a plazmacytoidalne komórki dendrytyczne w ludzkiej krwi wykazują ekspresję Siglec-5 [134]. Niektóre receptory Siglec spokrewnione z CD33 wykazują ekspresję ograniczoną głównie do jednego typu komórek. Mimo że niski poziom ekspresji ludzkiego receptora Siglec-7 opisano w granulocytach i monocytach, komórki NK uważane są za główny donor tego receptora. Poza

tym, receptor Siglec-8 został opisany wyłącznie na błonie komórkowej eozynofików, a Siglec-6 ulega ekspresji w komórkach trofoblastu [135]. Wyjątkiem są limfocyty T, w których stwierdzono bardzo niską ekspresję receptorów Siglec, poza mierzalną ekspresją receptorów Siglec-7 i Siglec-9 w podgrupie ludzkich komórek CD8+ [136].

1.7.4. Przekaznictwo wewnątrzkomórkowe

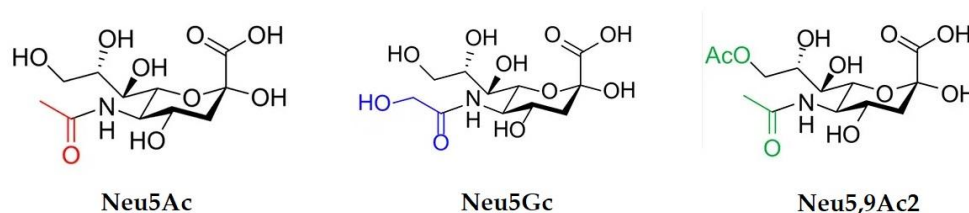
Wspólną cechą wszystkich znanych do tej pory receptorów Siglec jest ich struktura jako integralnych białek błonowych, w których strukturze wyróżnić można zewnątrzkomórkową N-końcową domenę V, po której występują w zmiennej ilości domeny C2. Uważa się, że domena V jest odpowiedzialna za zdolność receptora do rozpoznawania kwasów sjałowych, podczas gdy domeny C2 działają jako odstępniaki. Komórki odpornościowe wykazujące ekspresję receptora Siglec przekazują swoje sygnały wewnątrzkomórkowe za pośrednictwem kaskad sygnalizacyjnych związanych tzw. motywu aktywacji opartego na tyrozynie immunoreceptora (ITAM) lub motywu hamowania opartego na tyrozynie immunoreceptora (ITIM). Większość receptorów Siglec spokrewnionych z CD33 oraz CD22 działa poprzez kaskady sygnalizacyjne zależne od domeny sygnalizacyjnej ITIM, podczas receptory Siglec-14, -15 i -16 działają poprzez białko adaptorowe DAP12 zawierające domenę sygnalizacyjną ITAM [137]. Schemat szlaków sygnalizacyjnych zależnych od cytozolowych motywów sygnalizacyjnych ITAM i ITIM przedstawiono na Rycinie 7. Aktywujące receptory Siglec-14, -15 i -16, oddziałują z białkiem adaptorowym DAP12 zawierającym ITAM poprzez aminokwasy, które znajdują się w ich regionach transbłonowych. W konsekwencji cytozolowe receptory ITAM są fosforylowane na swoich resztach tyrozynowych przez kinazy Src, a następnie stają się miejscem wiązania dla kinaz białkowych Syk. Następnie kinazy te aktywują szereg dalszych czynników odpowiedzialnych za takie działania, jak fagocytoza, uwalnianie cytokin i migracja komórek. Kaskada sygnalizacyjna zależna od ITAM jest regulowana przez cytozolowe receptory sygnalizacyjne ITIM. Po związaniu ligandu motywy ITIM ulegają fosforylacji przez kinazy tyrozynowe z rodziny Src, co umożliwia rekrutację fosfataz SHP1 i SHP2 [138]. Aktywowane fosfatazy SHP-1 i SHP-2 defosforylują pośrednie sygnały wewnątrzkomórkowe, prowadząc do zakończenia sygnału aktywującego generowanego przez cytozolowy receptor ITAM. Wykazano, że mechanizm sygnalizacji wewnątrzkomórkowej oparty na receptorach Siglec połączonych z cytozolowym motywem sygnalizacyjnym ITIM, przeciwdziała sygnałom aktywacji z komórek związanych z ITAM i moduluje w ten sposób procesy związane z odpornością i homeostazą [139, 140,141,142].



Rycina 7. Ścieżki sygnalizacyjne aktywujących i hamujących receptorów błonowych receptorów związanych z cytozolowymi receptorami ITIM i ITAM; według Linnartz i wsp. 2010, w modyfikacji własnej [143].

1.7.5. Ligandy receptorów Siglec

Rodzina kwasów sjałowych składa się z około pięćdziesięciu dziewięciowęglowych monocukrów, które są pochodną kwasu neuraminowego [137]. Najczęstszymi formami występującymi w glikoproteinach błon komórkowych i płynów ustrojowych u ssaków są: kwas N-acetylo-5-neuraminowy nazywany zwyczajowo sjałowym (kwas sjałowy, SA, Neu5Ac, NANA), kwas N-glikoliloneuraminowy (Neu5Gc) i 5-acetylo-9-O-acetyloneuraminowy (Neu5,9Ac2).

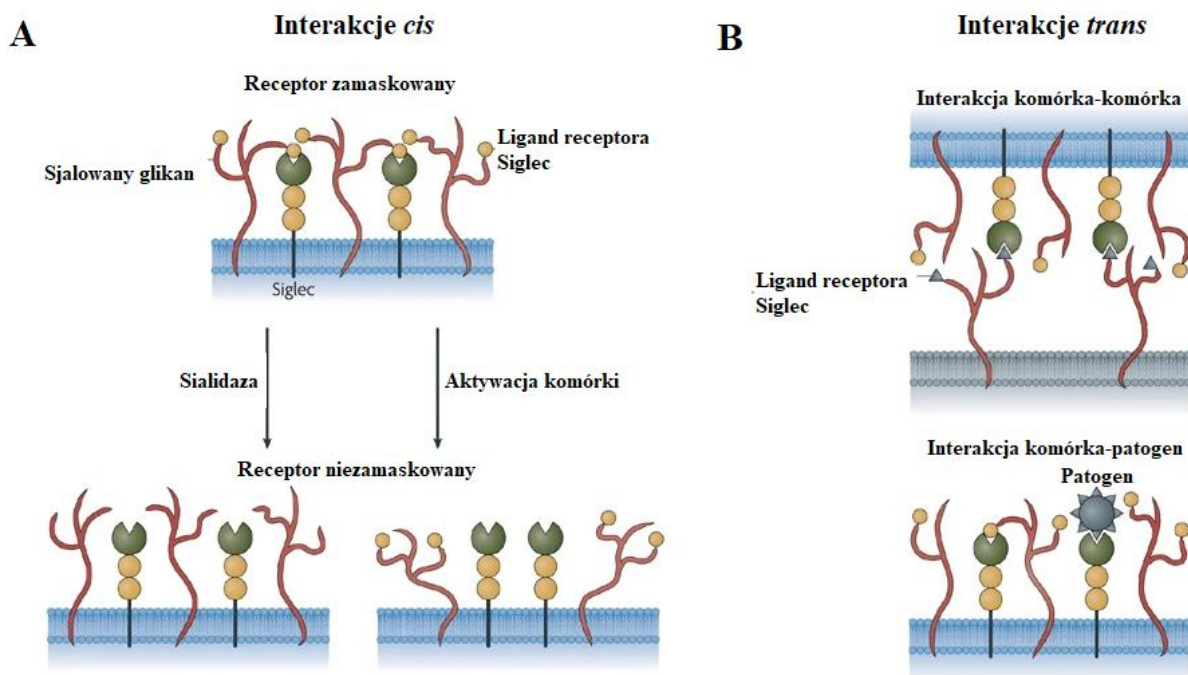


Rycina 8. Najczęściej występujące formy kwasu sjałowego w organizmach ssaków. Źródło: Tools for Glycan Analysis QA-Bio; <https://www.qa-bio.com/>

Kwas sialowy wchodzi w skład łańcuchów cukrowych przyłączanych do białek i lipidów w procesie glikozylacji. Analiza strukturalna glikoprotein wykazała, że kotranslacyjne i potranslacyjne modyfikacje poprzez przeniesienie poszczególnych jednostek cukrowych na rdzeń białkowy dotyczy około 80% białek komórki. Proces ten warunkuje dużą zmienność makrocząsteczek, co wiąże się z różnorodnością chemiczną monosacharydów tworzących łańcuch cukrowy, ich izomerii i tworzonych przez nie wiązań chemicznych. Badania strukturalne łańcuchów cukrowych wykazały, że większość glikokoniugatów wiąże kwas sialowy wiązaniem α 2,3-, α 2,6- i α 2,8-glikozydowym w końcowej części łańcucha cukrowego tworząc sialoglikany. Ze względu na obecność kwasu sialowego, glikoproteiny nadają błonom komórkowym ładunek ujemny, co ma szczególne znaczenie w regulacji adhezji podczas oddziaływań międzykomórkowych i komunikacji z macierzą zewnątrzkomórkową, a także wpływa na właściwości fizykochemiczne makrocząsteczek tj. konformację, rozpuszczalność i lepkość [144]. Procesy te leżą u podstaw mechanizmu odpowiedzi immunologicznej, zapłodnienia, tworzenia śladów pamięciowych w mózgu oraz sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Na szczególną uwagę zasługuje nieprawidłowa glikozylacja w przebiegu wielu stanów patologicznych, która stwarza dodatkowe możliwości diagnozowania i poszukiwania nowych kierunków terapeutycznych. Skład i strukturę łańcuchów cukrowych regulują sialotransferazy i sialidazy, których specyficzna komórkowa i tkankowa ekspresja oraz aktywność zależy od stanu fizjologicznego i czynników zewnętrznych. W warunkach fizjologicznych stopień sjalilacji błony komórkowej zależy od równowagi między ekspresją i aktywnością sialotransferaz i sialidaz katalizujących procesy syntezy i rozkładu łańcuchów cukrowych. Wykazano, że nadekspresja sialotransferaz podczas transformacji i progresji nowotworu skutkuje nieprawidłową sjalilacją komórek nowotworowych, a zwiększona ekspresja silnie sjalowanych struktur, w tym sialoglikoprotein i sialogangliozydów, jest cechą charakterystyczną wielu komórek nowotworowych. Dotychczasowe badania wykazały, że rozwój nowotworów złośliwych koreluje ze wzrostem ekspresji kwasu sialowego, a zmiany wzoru sjalilacji mogą służyć prognozowaniu wystąpienia patologii, jej rozpoznania i monitorowania leczenia. Jedną z najważniejszych funkcji biologicznych kwasu sialowego jest jego bezpośredni udział w procesach rozpoznawania biologicznego. Wiązanie specyficznych sialoglikoprotein błonowych został uznany za kluczowy etap adsorpcji czynników patogennych na błonach komórkowych gospodarza i inwazji tkanek i narządów. Proces ten jest znanym mechanizmem niektórych zakażeń bakteryjnych (*Escherichia coli*, *Streptococcus suis*), wirusowych (*wirus grypy typu A, B, C*; *Cardiovirus*; *Paramyxovirus*) i pierwotniakowych (*Plasmodium falciparum*) [133]. W przebiegu procesów nowotworowych, sialoglikany,

zwłaszcza epitopy sjalo-Lewis^{a, b, x, y}, regulują procesy interakcji z selektynami, które są molekularną podstawą procesów adhezyjnych towarzyszących migracji komórek odpornościowych do narządów docelowych przez śródbłonek naczyń i poza układem krążenia. Ten mechanizm został uznany za podstawę migracji wysoce sjalowanych komórek nowotworowych w procesie przerzutowania, a epitopy sjalo-Lewis uznane są za markery nowotworowe o wartości prognostycznej. Badania ostatnich lat w zakresie glikobiologii wskazują również na oddziaływania błonowych sjalowanych glikanów z immunoreceptorami z rodziny Siglec i ich rolę w regulacji funkcji układu immunologicznego [119, 145,146,147,148].

Receptory Siglec rozpoznają różne formy i wiązania kwasów sjalowych, które powszechnie występują na powierzchni komórki. Większość zbadanych receptorów Siglec ma zachowaną resztę argininową w domenie V, która wpływa na funkcje receptora oraz umożliwia optymalne rozpoznawanie kwasów sjalowych. Cała grupa receptorów Siglec cechuje się stosunkowo niskim powinowactwem do najczęściej występujących na błonie komórek ssaków połączeń kwasu sjalowego i galaktozy Neu5Ac(α 2-3)Gal oraz Neu5Ac(α 2-6)Gal. Jednak poszczególne receptory cechują się specyficznością oraz zdolnością do rozpoznawania zróżnicowanego zestawu naturalnych struktur sjalozydowych. Dla przykładu, Siglec 2 ma silną preferencję dla Neu5Ac (α 2-6) Gal, a Siglec-7 oraz Siglec-11 preferują sjalozydy o strukturze Neu5Ac (α 2-8) [149,150]. W procesie regulacji aktywności komórkowej za pośrednictwem receptorów Siglec, duże znaczenie ma możliwość wiązania się ligandów na drodze interakcji *cis* i *trans*. Większość receptorów Siglec jest wyciszonych poprzez tworzenie połączeń *cis* z kwasami sjalowymi tej samej błonie komórkowej zmniejszając tym samym aktywność biologiczną z ligandami w połączeniu *trans*. Wyjątkiem jest receptor Siglec-1, który ze względu na swoją budowę złożoną z 16 domen V łatwiej wiąże ligandy w połączeniach *trans* [151]. Miejsca wiązania receptorów Siglec mogą być maskowane przez interakcje *cis* z kwasami sjalowymi na tej samej komórce, co następnie uniemożliwia im pośredniczenie w interakcjach *trans* komórka-komórka (Rycina 9).



Rycina 9. Interakcje *cis* (A) i interakcje *trans* (B) receptorów Siglec; według Crocker i wsp. 2007, w modyfikacji własnej [152].

Badania wskazują, że większość receptorów Siglec na komórkach w stanie spoczynku znajduje się w zamaskowanej formie. Badania Crockera i Gordona wykazały, że zdemaskowanie receptorów następuje podczas aktywacji komórki, dlatego też uważa się, że interakcje *cis* mogą potencjalnie regulować funkcje receptorów Siglec [153,154]. Wykazano, że po ekspozycji komórek na sialidazę, która rozszczepia ligandy Siglec przez interakcje *cis* (Rycina 9A), receptory Siglec zostają zdemaskowane, co pozwala im na interakcje z ligandami w *trans* (Rycina 9B). W przypadku, gdy receptor zostanie zdemaskowany, może związać się ze swoim celem w przez interakcje *trans* na innej powierzchni komórki. W rezultacie kaskada sygnalizacyjna poprzez cytozolowy receptor ITIM zostaje aktywowana i następuje efekt hamujący, który antagonizuje receptor ITAM [152].

1.7.6. Rola receptorów Siglec w układzie immunologicznym

Jedną z podstawowych funkcji receptorów Siglec jest tłumienie funkcji układu immunologicznego poprzez rozpoznawanie i łączenie elementów sjałomu komórkowego w ramach interakcji *cis* i *trans* i aktywację szlaków sygnałowych związanych z cytozolowym motywem ITIM. Liczne badania wskazują na ważną rolę receptorów Siglec spokrewnionych z CD33 w modulowaniu zachowania leukocytów, w tym hamowaniu proliferacji komórkowej, indukcji apoptozy, hamowaniu aktywacji komórkowej, indukcji wydzielania cytokin prozapalnych oraz supresji produkcji interferonu- α [155]. Receptory Siglec spokrewnione z

CD33 mogą również pełnić funkcję receptorów endocytarnych, których zadaniem jest usuwanie sjalowanych antygenów oraz promowanie lub hamowanie prezentacji antygenów [156]. Oprócz receptorów spokrewnionych z CD33, ważną funkcję w regulacji układu immunologicznego przypisuje się receptorom sjaloadhezyjne jako regulatorowi prozapalnych funkcji makrofagów [157]. Ponadto, Siglec-2 jest regulatorem sygnalizacji w komórkach B, która leży u podstaw homeostazy i przeżywalności tych komórek poprzez ustalenie progu aktywacji komórek przez antygen. Ważną funkcją receptorów z rodziny Siglec jest również ich zdolność do interakcji z sjaloglikanami bakteryjnymi, m.in. *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus grupy B* i *Trypanosoma cruzi* [158, 159, 160, 161]. Zależny od receptorów Siglec wychwyt tych patogenów może być korzystny dla gospodarza, gdyż promuje niszczenie patogenów i prezentację antygenów.

1.7.7. Rola receptorów Siglec w rozwoju chorób nowotworowych

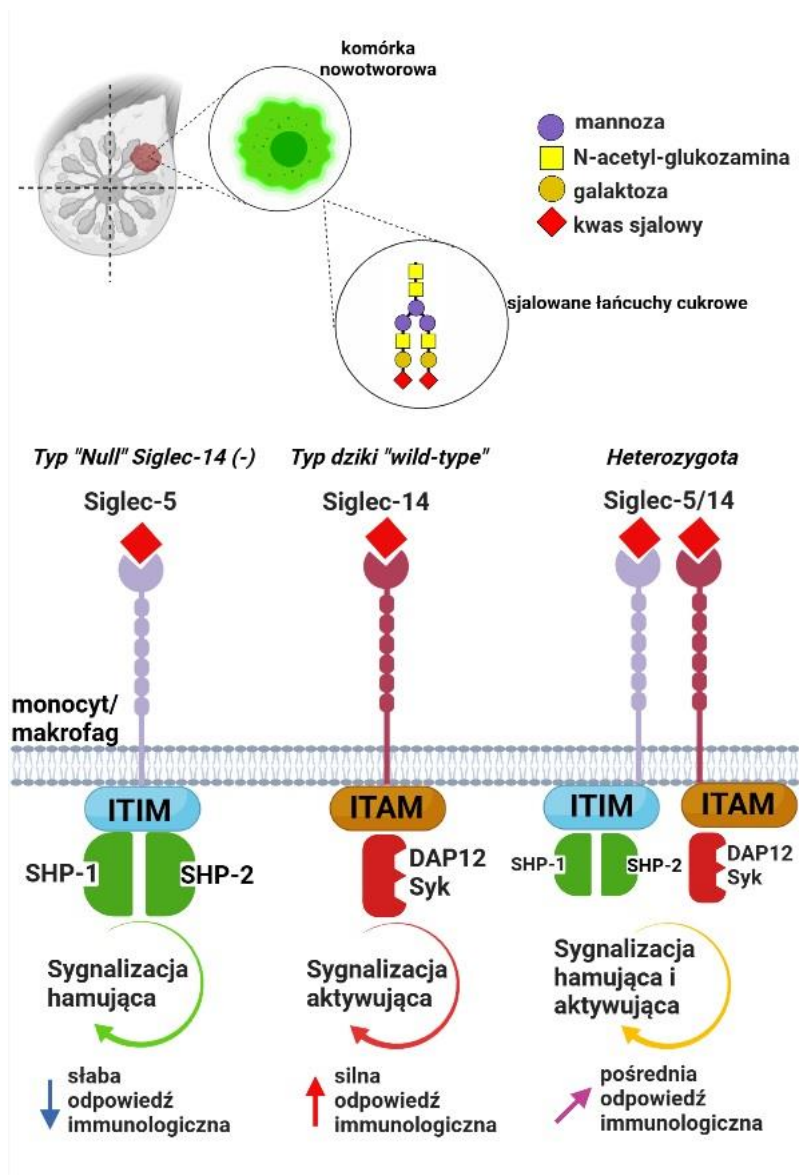
Badania w zakresie glikobiologii wykazały, że sjalilacja błon komórkowych jest powszechną cechą komórek nowotworowych, dlatego ich wzajemne oddziaływanie z komórkami układu immunologicznego ekspresyjnymi receptory Siglec w mikrośrodowisku guza są uważane za mechanizm, który kształtuje odpowiedź immunologiczną w nowotworach złośliwych. Wzorzec sjalilacji w nowotworach jest wysoce niejednorodny w określonych typach nowotworów i określa profile zaangażowanych subpopulacji komórek odpornościowych wykazujących ekspresję Siglec. Zgodnie z przedstawionym w podrozdziale 1.7.4. opisem ścieżek przekazywania sygnału, po związaniu kwasu sjalowego z receptorem Siglec włącza się kaskada szlaków sygnałowych modulująca odpowiedź immunologiczną. Wykazano, że w progresji nowotworu największe znaczenie mają receptory Siglec ze zdolnością do transdukcji sygnału hamującego. Komórki nowotworowe wykorzystują więc wysoką ekspresję kwasu sjalowego na swoją korzyść. Modyfikują one układ odpornościowy co prowadzi do immunosupresji. Wyciszenie efektorowych komórek odpornościowych hamuje aktywację odpowiedzi immunologicznych, a to w konsekwencji skutkuje tolerancją immunologiczną i wzrostem komórek guza nowotworowego. Przykładem zwiększonej sjalilacji na powierzchni komórek rakowych jest „self-associated molecular pattern” (SAMP), który powoduje, że receptory Siglec znajdujące się na leukocytach znacznie zmniejszają odpowiedź immunologiczną [162]. Dotychczasowe badania wykazały, że wysoce sjalowane ligandy ekspresowane na powierzchni komórek nowotworowych osłabiają nadzór immunologiczny i aktywność przeciwnowotworową w makrofagach mikrośrodowiska guza nowotworowego przez wiązanie z supresyjnymi receptorami Siglec-7 i Siglec-9. Zjawisko to

potwierdzono w przebiegu nowotworów płuc i skóry [163,164]. W przebiegu nowotworów piersi szczególne znaczenie w procesie tłumienia odporności przeciwnowotworowej przypisuje się receptorom Siglec-8 i Siglec10 [165,166]. Szerokie spektrum wiązania sjałoglikanów zwiększa więc znaczenie osi kwas sjałowy-receptor Siglec w przeciwnowotworowym procesie regulacyjnym. Wyniki badań na modelach komórkowych glejaka oraz badanie na modelach zwierzęcych potwierdziły, że interakcja komórkowa między mysim złośliwym glejem a komórkami odpornościowymi za pośrednictwem osi kwas sjałowy - Siglec-F lub Siglec-E wspiera funkcje promujące nowotwór, w tym przebudowę macierzy pozakomórkowej i rekrutację immunosupresyjnych komórek mieloidalnych [108,110]. Według Engbloma i wsp, obecność neutrofilii ekspresujących receptor Siglec-F sprzyja wzrostowi raka i koreluje ze złym rokowaniem [111]. Udział osi Siglec-sjałoglikany w utrzymaniu homeostazy immunologicznej sugeruje, że ukierunkowana manipulacja tymi procesami może otworzyć nową drogę terapeutyczną w wielu zaburzeniach o podłożu immunologicznym. Badania kliniczne nad nowotworami i chorobami autoimmunologicznymi wykazały korzystne działanie przeciwciał monoklonalnych anty-CD22 i CD33, w szczególności skoniugowanych z immunotoksynami. Ostatnio doniesiono, że Siglec-9 i Siglec-15 są kluczowymi inhibitorami odporności przeciwnowotworowej, które mogą być blokowane przez przeciwciała monoklonalne w nowym leczeniu przeciwnowotworowym [167,168]. Możliwość interakcji na osi Siglec-kwas sjałowy, kontrola syntezy i zmiana ekspresji sjałilacji guza może wpłynąć potencjalnie na modulację odpowiedzi przeciwnowotworowej. Optymalnym wydaje się być opracowanie mechanizmów działania leków zwiększających udział receptorów Siglec aktywujących, przy jednoczesnym blokowaniu immunosupresyjnego działania receptorów Siglec hamujących. Większość prowadzonych badań dotyczy regulacji receptorów Siglec-2 oraz Siglec-3. Dostępne w praktyce klinicznej Inotuzumab ozogamicin oraz Moxetumomab pasudotox są lekami skierowanymi przeciwko CD22 zarejestrowanymi do leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej i białaczki włochatokomórkowej, a Gemtuzumab ozogamicin może być stosowany jako przeciwciało anty-CD33 skoniugowane z cytostatykiem do leczenia ostrej białaczki szpikowej [169,170,171]. Trwają również intensywne badania obejmujące grupę Siglec-7, Siglec-9, Siglec-10, Siglec-15. Wiedza na temat roli sparowanych immunoreceptorów Siglec5/14 i ewentualnych leków modulujących ich działanie jest stale niewystarczająca i wymaga dalszego pogłębienia. Niemniej jednak na podstawie powyższych rozważań widać, że opisywane receptory wymagają dalszych badań.

1.7.8. Sparowane immunoreceptory Siglec5 i Siglec-14

Receptory Siglec-5 i Siglec-14 należą do podgrupy ludzkich receptorów Siglec spokrewnionych z CD33. Analiza ich dystrybucji potwierdziła ich ekspresję receptora Siglec-5 na powierzchni komórek szpiku układu krwiotwórczego, neutrofilach, monocytach, komórkach dendrytycznych, w makrofagach tkankowych, limfocytach B, komórkach tucznych i aktywowanych limfocytach T [134]. Podobnie do większości receptorów spokrewnionych z CD33, Siglec-5 zawiera w swojej budowie 4 zewnątrzkomórkowe domeny Ig-podobne oraz cytozolowe motywy sygnalizacyjne ITIM których podstawową funkcją jest fosforylacja tyrozyny i rekrutacja fosfataz tyrozynowych SHP-1 i SHP-2 [172]. Efektem aktywacji ścieżek sygnalizacyjnych zależnych of ITIM oraz fosfataz SHP-1 i SHP-2 udział receptora w hamowaniu wrodzonych odpowiedzi immunologicznych. Receptor ten ma szeroki zakres rozpoznawania struktur kwasu sjałowego związanego z łańcuchem cukrowym wiązaniami α 2-3, α 2-6 i α 2-8. Ludzki receptor Siglec-14 jest białkiem transbłonowym zawierającym 396 reszt aminokwasowych, złożonym z trzech domen Ig-podobnych, domeny transbłonowej i fragmentu cytoplazmatycznego. W przeciwieństwie do większości receptorów Siglec spokrewnionych z CD33, część cytoplazmatyczna receptora Siglec-14 nie zawiera ITIM. Cechą, która nadaje mu charakter receptora aktywującego jest reszta Arg362 w domenie transbłonowej, przez którą receptor łączy się z cząsteczką adaptorową DAP12 [173]. Cechą charakterystyczną obu receptorów jest znaczna podobieństwo sekwencji genomowych, co oznacza, że Siglec-14 wykazuje podobne powinowactwo i zdolność wiązania tych samych ligandów jak Siglec-5 (Rycina 10).

W obrębie ektodomeny oba receptory charakteryzują się 74% homologią w zakresie sekwencji białek. Siglec-5 zawiera domenę inhibitorową ITIM, aby zrównoważyć aktywację Siglec 14, który to rekrutuje białko aktywujące DAP12, zawierające domenę ITAM [173, 174]. Podobieństwo sekwencji aminokwasowej zewnątrzkomórkowej części receptora i identyczna dystrybucja w tkankach i komórkach (makrofagi i neutrofile) wynika z częściowej konwersji leżących blisko siebie genów SIGLEC5 i SIGLEC14 w procesie ewolucji na chromosomie 19q13.41. W organizmie ludzkim, klaster genu SIGLEC typu dzikiego (wild-type) zawiera oba geny SIGLEC-5 i SIGLEC-14 w tandemie, podczas gdy pochodny allel zawiera pojedynczy gen fuzyjny SIGLEC-5/14 [175]. Produkt genu fuzyjnego SIGLEC-5/14 jest identyczny na poziomie aminokwasowym z produktem genu SIGLEC-5 typu dzikiego, a allel określany jest jako SIGLEC-14-Null. Konsekwencją tego zjawiska jest zależna od genotypu osobnika ekspresja receptorów Siglec-5 i Siglec-14 (Rycina 11) [176]. Wykazano, że ludzkie monocyty



Rycina 11. Regulacja odpowiedzi immunologicznej przez sparowane receptory Siglec-5/14 (opracowanie własne).

II. CELE PRACY

Badania ostatnich lat wykazały, że mechanizmy rozwoju nowotworów wykraczają poza zmiany wewnątrzkomórkowe i dotyczą interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi i otaczającym środowiskiem. Mikrośrodowisko guza jest ściśle związane z progresją nowotworów, a interakcja komórek nowotworowych z ich otoczeniem odgrywa kluczową rolę w angiogenezie, wzroście guza, rozprzestrzenianiu się komórek nowotworowych, lekooporności i odpowiedzi immunologicznej.

Celem pracy jest ocena wpływu tamoksyfenu na aktywność komórek układu immunologicznego na przykładzie monocytów oraz udziału sparowanych receptorów Siglec-5/14 w procesie nadzoru immunologicznego w komórkowym modelu nowotworu piersi.

Podjęto następujące cele:

- 1) Zbadanie cytotoksycznego wpływu tamoksyfenu na komórki raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 oraz monocytów linii THP-1 hodowanych w warunkach monokultury i kokultury.
- 2) Zbadanie wpływu tamoksyfenu na aktywność immunologiczną monocytów linii THP-1 hodowanych w warunkach monokultury lub w kokulturze z komórkami raka piersi MCF-7 i MDA-MB-231.
- 3) Zbadanie wpływu tamoksyfenu na ekspresję receptorów Siglec-5 i Siglec-14 oraz związanych z nimi elementów wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych na poziomie genów i białka w monocytach linii THP-1 hodowanych w warunkach monokultury lub w kokulturze z komórkami raka piersi MCF-7 i MDA-MB-231.
- 4) Zbadanie wpływu tamoksyfenu na interakcję sparowanych receptorów Siglec-5 i Siglec-14 z błonami komórek raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 hodowanych w warunkach monokultury lub w kokulturze z monocytami linii THP-1.

III. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Podłoża hodowlane i dodatki:

- Podłoże hodowlane RPMI-1640; ATCC, USA
- Surowica płodowa bydłęca; Eurx, Polska
- Roztwór antybiotyków PenStrep (penicylina + streptomycyna; 10000U/ml); Gibco, USA
- 0,25% roztwór trypsyny z dodatkiem 0,913 mM EDTA; Gibco, USA
- 2-merkaptoetanol, roztwór 55 mM; Gibco, USA

3.1.2. Odczynniki

- Woda demineralizowana
- Alkohol etylowy 70%; Chempur, Polska
- Tamoksyfen; Dr. Ehrenstofer GmbH; Niemcy
- mirystynian-13-octan forbolu (PMA); Merck, USA
- Triton X-100; Merck, USA
- Dimetylosulfotlenek (DMSO); Merck, USA
- bromek 3-(4,5- dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy; Merck, USA
- Glicyna; POCh, Polska
- Chlorek sodu (NaCl); POCh, Polska
- Buforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS; bez jonów wapnia i magnezu); PAN-BioTech, Niemcy
- Zestawy RNeasy Mini Kit; QIAGEN, Niemcy
- Chloroform; Merck, USA
- Odczynniki do reakcji odwrotnej transkrypcji SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA)
- QuantiTect™ SYBR®Green PCR Master Mix (QIAGEN, Niemcy)
- Startery dla genów SIGLEC5; SIGLEC14, SHP1 (PTPN6), SHP2 (PTPN11), DAP12 (TYROBP) i genu referencyjnego GAPDH - QuantiTect Primer Assay (QIAGEN, Niemcy)

3.1.3. Przeciwciała, białka fuzyjne i gotowe zestawy komercyjne:

- CD68-FITC, przeciwciało monoklonalne, klon eBioY1/B2A (Y1/82A); Invitrogen, USA
- Arginaza-1, przeciwciało poliklonalne; Invitrogen, USA
- Siglec-5/14-FITC, przeciwciało monoklonalne; R&D Systems, USA

- Immunoglobuliny izotypowe klasy IgG skoniugowane z FITC; Invitrogen USA
- Przeciwciała drugorzędowe klasy IgG skoniugowane z FITC; Invitrogen, USA
- Przeciwciało drugorzędowe klasy IgG z fragmentem Fc skoniugowane z FITC; Jackson ImmunoResearch, USA
- Komercyjny zestaw do oznaczania cytokin IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF α - BD CBA Human Inflammatory Cytokine Kit; Becton Dickinson, USA
- Białko fuzyjne Siglec-5/Fc Chimera; R&D Systems, USA
- Białko fuzyjne Siglec-14/Fc Chimera; R&D Systems, USA

3.1.4. Materiały niezbędne do prowadzenia hodowli komórkowej:

- Butelki do hodowli komórkowej T25 (25 cm²); Sarstedt, Niemcy
- Butelki do hodowli komórkowej T75 (75 cm²); Sarstedt, Niemcy
- Probówki sterylne 15 ml; Sarstedt, Niemcy
- Probówki sterylne 50 ml; Sarstedt, Niemcy
- Płytki do hodowli 6-dołkowe; Sarstedt, Niemcy
- Pipety serologiczne 10 ml; Sarstedt, Niemcy
- Pipety Pasteura szklane; Hirschman, Niemcy
- Końcówki sterylne z filtrem do pipet automatycznych; Sarstedt, Niemcy
- Zestaw płytek 6-dołkowych z insertami 0,4 μ m; Greiner Bio-One, Austria
- Inserty silikonowe dwukomorowe; Ibidi, Niemcy
- Probówki cytometryczne; Falcon, USA

3.1.5. Sprzęt:

- Cytometr przepływowy FACS CantoII; Becton Dickinson, USA
- Cytometr przepływowy FACS Lyric; Becton Dickinson, USA
- Termocykler PTC 200 (MJ Research, USA)
- System detekcji fluorescencji Real Time PCR CFX 96 Connect; Bio-Rad, USA
- Spektrofotometr dwuwiązkowy VWR UV-6300PC; VWR, Belgia
- Spektrofotometr UV-ViS NanoDrop 2000; Thermo Scientific, USA
- Wirówka laboratoryjna Capp CRC-416X; CAPP, Dania
- Wytrząsarka Ika Vortex 3; IKA, Niemcy
- Łażnia wodna Ika, IKA, Niemcy
- Inkubator CO₂ Memmert ICO150; Memmert, Niemcy
- Komora laminarna NuAire Biohazard NU-440; NuAire, USA

- Mikroskop kontrastowo-fazowy Leica DMIL LED; Leica, Niemcy
- Pipeta automatyczna akumulatorowa Pipetus; Hirschman Laborgeräte, Niemcy
- Pipety automatyczne Eppendorf 1-10 μl , 10-100 μl , 20-200 μl , 100-1000 μl , 1000-5000 μl ; Eppendorf, Niemcy

3.1.6. Oprogramowanie:

- Flowing Software, wersja 2.5.1; Finlandia
- FlowJo, wersja 10.8.1; USA
- ImageJ, wersja 1.46; USA
- InStat, wersja 3.05; USA

3.2. Linie komórkowe

Zadania badawcze zrealizowano w oparciu o komercyjne linie komórkowe raka sutka MCF-7 i MDA-MB-231 oraz linię komórkową ludzkiej białaczki monocytarnej THP-1. Linie komórkowe pozyskano z American Type Culture Collection (ATCC). Podstawą klasyfikacji linii komórkowych do badań były właściwości biologiczne komórek oraz możliwości ich aplikacji w zaplanowanym modelu eksperymentalnym.

3.2.1. Linia komórkowa ludzkiego raka sutka MCF-7

Linia komórkowa MCF-7 powstała z wyсіęku opłucnowego 69-letniej kobiety z rozpoznaniem gruczolakorakiem sutka. Komórki MCF-7 zachowują szereg morfologicznych cech podobnych do nabłonka sutka. W profilu receptorowym wykazano ekspresję receptora estrogenowego alfa ($\text{ER-}\alpha$), a także receptory androgenowe, progesteronowe i glukokortykoidowe. Badania eksperymentalne wykazały, że stymulacja komórek MCF-7 estrogenami wywiera efekt przeciwapoptotyczny, podczas gdy narażenie na leki antyestrogenowe (np. tamoksyfen) zmniejsza wzrost hodowli przez hamowanie proliferacji i indukowanie apoptozy [179].



Rycina 12. Komórki MCF-7 w hodowli 48 godzin po wysianiu; pasaż 12. Zdjęcie wykonano w Zakładzie Farmakologii Klinicznej UM w Białymstoku; fot. Karol Rogowski. Powiększenie 100x.

3.2.2. Linia komórkowa ludzkiego raka sutka MDA-MB-231

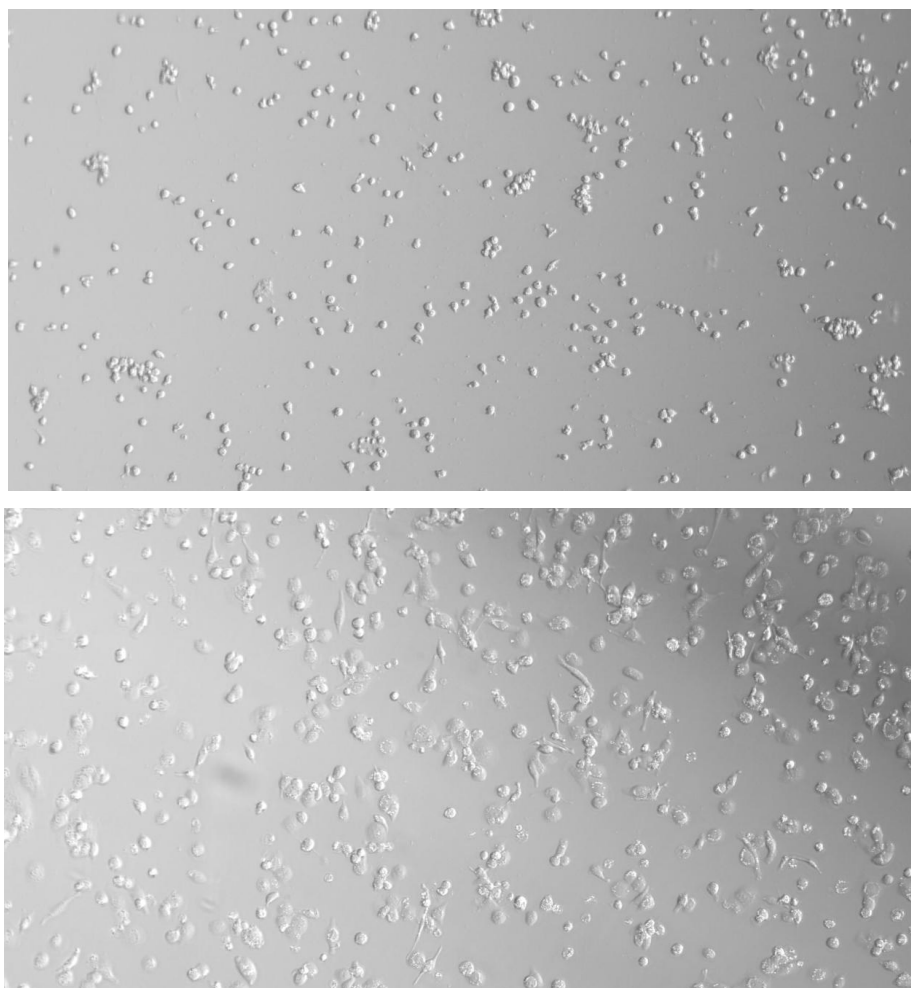
Linia komórkowa MDA-MB-231 jest nabłonkową linią komórkową ludzkiego raka piersi, która powstała z wysięku opłucnowego 51-letniej kobiety rasy kaukaskiej z przerzutowym gruczolakorakiem sutka. Linia MDA-MB-231 charakteryzuje się wysokim potencjałem inwazyjnym, u którego podstaw leży słabe zróżnicowanie komórek i ich wysoka aktywność proteolityczna względem macierzy pozakomórkowej. Badania profilu receptorowego opisują linię MDA-MB-231 jako potrójnie ujemny rak piersi (TNBC; triple negative breast cancer), ponieważ nie wykazano ekspresji receptora estrogenowego (ER), receptora progesteronu (PgR) i receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2) [180].



Rycina 13. Komórki MDA-MB-231 w hodowli 24 godziny po wysianiu; pasaż 13. Zdjęcie wykonano w Zakładzie Farmakologii Klinicznej UM w Białymstoku; fot. Karol Rogowski. Powiększenie 100x.

3.2.3. Linia komórkowa ludzkiej białaczki monocytarnej THP-1

Linia komórkowa THP-1 powstała z krwi obwodowej rocznego chłopca z ostrą białaczką monocytową. Analiza cytologiczna komórek THP-1 wykazała, że przypominają one pierwotne monocyty i makrofagi pod względem właściwości morfologicznych, zdolności różnicowania i ekspresji specyficznych markerów. W warunkach eksperymentalnych, ekspozycja zawiesiny monocytowych komórek THP-1 na 12-mirystynian-13-octan forbolu (PMA) zwiększa ich adhezję do płytek hodowlanych i zmienia morfologię, co jest cechą różnicowania monocytów w makrofagi. Monocyty traktowane PMA charakteryzują się płaskim i ameboidalnym kształtem z dobrze rozwiniętym aparatem Golgiego i szorstką siateczką śródplazmatyczną, dużą liczbą rybosomów w cytoplazmie, niższym tempem proliferacji, wyższym tempem fagocytozy i wyższą ekspresją CD11b i CD14 na powierzchni błony komórkowej [181].



Rycina 14. Komórki THP-1 w hodowli 24 godziny po wysianiu (A) i po 48 godzinnej inkubacji z 12-mirystynian-13-octanem forbolu (B). Zdjęcie wykonano w Zakładzie Farmakologii Klinicznej UM w Białymstoku; fot. Karol Rogowski. Powiększenie 100x.

3.3. Metody

3.3.1. Hodowle komórkowe

W badaniach wykorzystano standardowe techniki hodowli komórkowej, których celem było uzyskanie jednorodnych populacji komórek. Hodowlę komórek linii MCF-7, MDA-MB-231 i THP-1 prowadzono w inkubatorze Memmert ICO150 (Memmert; Niemcy) w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C. Podłoże dla adherentnych komórek MCF-7 i MDA-MB-231 stanowiło medium hodowlane RPMI-1640 z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS) i 1% mieszaniny antybiotyków zawierającej penicylinę (50 U/ml) i streptomycynę (50 mg/ml). Hodowle komórek adherentnych o konfluentności około 80% pasażowano przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny co 3 dni i utrzymywano w hodowli nie dłużej niż 2 miesiące od rozmrożenia. Nieadherentne komórki THP-1 hodowano w podłożu RPMI-1640 zawierającym 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS), 1% mieszaniny antybiotyków oraz 0,05 mM merkaptoetanolu. Zawiesinę komórek pasażowano co 3-4 dni, a do badań wykorzystano komórki między 8 a 12 pasażem.

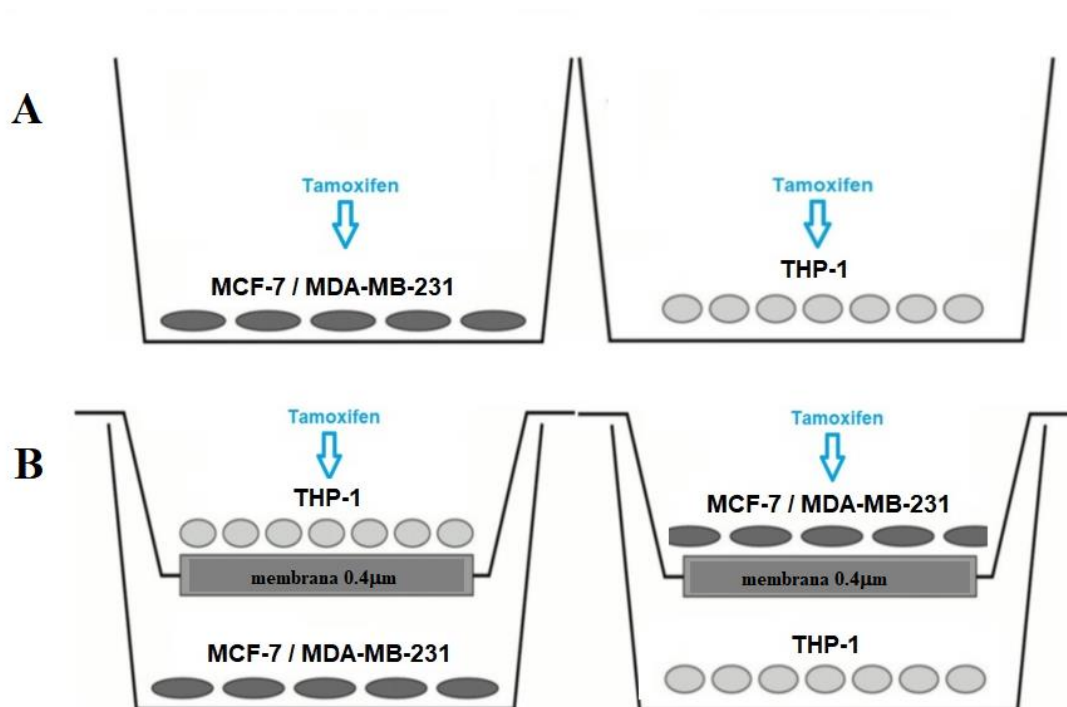
Zgodnie z przyjętym modelem eksperymentalnym, badanie przeprowadzono w warunkach monokultury i kokultury. Monokultury komórek nowotworowych i monocytów wykonano na sterylnych polistyrenowych płytkach 6-dołkowych. Komórki wysiano w ilości 1x10⁵ komórek/dołek. Liczbę komórek określono za pomocą automatycznego licznika komórek Scepter 3.0 (Merck, USA). Do badań zastosowano monokultury o gęstości komórek około 80%. Hodowla w systemie insertów została wykorzystana jako model kokultury pośredniej. Wstępnie, komórki nowotworowe wysiano na sterylnej płytce 6 dołkowej, a w każdym dołku umieszczono insert (ThinCert, Greiner, Niemcy) z komórkami THP-1. Stosunek ilościowy monocytów do komórek nowotworowych wynosił 10:1. Populacje komórek oddzielała porowata membrana z tetraftalanu polietylenu o rozmiarze porów 0,4 μm, która uniemożliwiała fizyczne kontakty między populacjami, ale pozwalała na chemiczną komunikację między nimi.

3.3.2. Badanie wpływu tamoksyfenu na żywotność komórek MCF-7, MDA-MB-231 i THP-1

W niniejszej pracy analizie poddano modulujący wpływ tamoksyfenu na komórki raka sutka i monocyty w warunkach monokultury i kokultury. Zastosowana dawka została określona w badaniach wstępnych opartych na modelu oceny cytotoksyczności tamoksyfenu i jego wpływie na potencjał inwazyjny komórek nowotworowych.

Tamoksyfen został rozpuszczony w dimetylosulfotlenku (DMSO) i dodany do hodowli komórek do osiągnięcia stężeń: 0,1; 1; 10 i 50 μM. Stężenie DMSO w badanych próbach nie przekraczało stężenia 0,1%. Czas inkubacji komórek z tamoksyfenem wynosił 24 godziny w

standardowych warunkach przyjętych dla hodowli komórkowych (37°C; 5% CO₂). Spośród testowanych stężeń do dalszych badań wybrano dawkę 10 µM ze względu na największe powtarzalne działanie cytotoksyczne tamoksyfenu mierzone testem MTT.



Rycina 15. Hodowle komórek MCF-7, MDA-MB-231 i THP-1 w warunkach monokultury (A) i kokultury (B) poddanych 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen.

3.3.2.1. Test MTT

Test MTT został wykorzystany w celu określenia żywotności komórek po ekspozycji na wybrane stężenia tamoksyfenu. Test opiera się na reakcji barwnej, która wynika ze zdolności mitochondrialnej dehydrogenazy do przekształcania pomarańczowego, rozpuszczalnego w wodzie bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowego do nierozpuszczalnego w wodzie błękitnego formazanu.

Adherentne komórki MCF-7 i MDA-MB-231 wysiewano na 6-dołkowej płytce w ilości 1×10^5 /dołek i utrzymywano w hodowli do osiągnięcia konfluencji około 80%. W celu zbadania wpływu tamoksyfenu na żywotność komórek nowotworowych w warunkach kokultury w każdym dołku umieszczono insert z komórkami THP-1. Komórki traktowano przez 24 godziny tamoksyfenem o stężeniu 0,1; 1; 10 i 50 µM. Po 24 godzinnej inkubacji medium odessano za pomocą pompki próżniowej, a komórki przepłukano 500 µl roztworu PBS o temperaturze 37°C. Dołki opróżniono poprzez odessanie PBS, dodano 1 ml PBS i 50 µl roztworu MTT o stężeniu

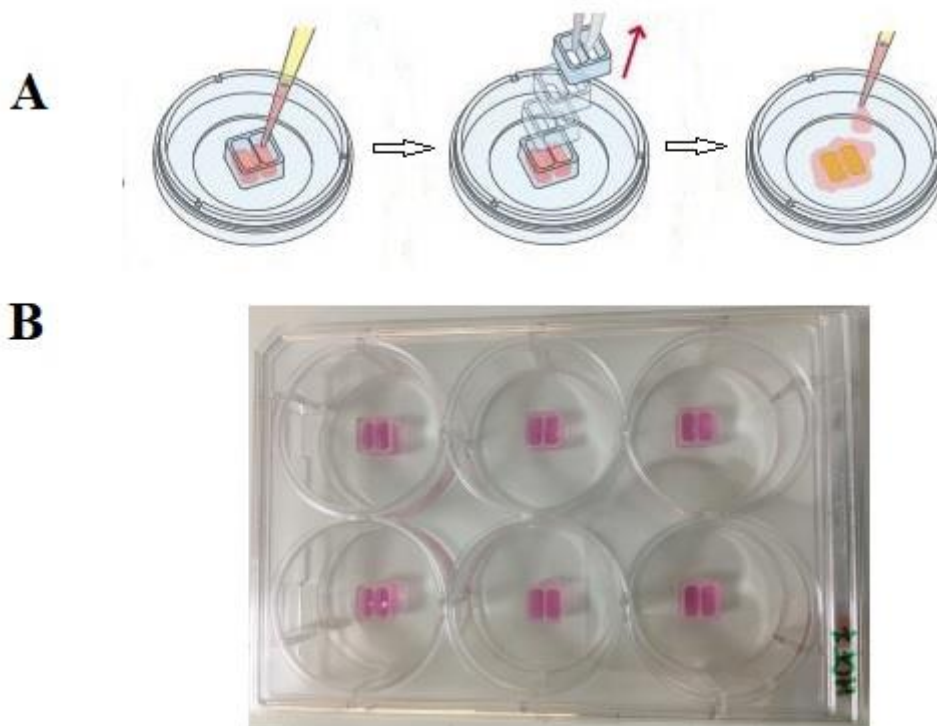
1mg/ml i inkubowano 30 minut w 37°C. Następnie do każdego dołka dodano 1 ml DMSO, a po 10 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej dodano 10 µl buforu Sorensena o pH 10,5 zawierającego 0,1 M glicyny i 0,1 M NaCl. Zawartość dołków lekko zmieszano i odczytano absorbancję przy długości fali 570 nm za pomocą spektrofotometru VWR UV-6300PC.

W celu zbadania wpływu tamoksyfenu na monocyty hodowane w warunkach monokultury i kokultury, komórki THP-1 poddano 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen o stężeniu 0,1; 1; 10 i 50 µM. Komórki przeniesiono do probówek laboratoryjnych z dnem stożkowym i wirowano na wirówce laboratoryjnej (CAPP CRC-416X, 1220 obr./min; 5 minut). Komórki zawieszono w 1 ml PBS z dodatkiem 50 µl roztworu MTT o stężeniu 1mg/ml i inkubowano 90 minut w 37°C. Komórki ponownie odwirowano, zawieszono w 1 ml DMSO i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie dodano 10 µl buforu Sorensena o pH 10,5 zawierającego 0,1 M glicyny i 0,1 M NaCl. Zawartość probówek delikatnie zmieszano i odczytano absorbancję przy długości fali 570 nm.

3.3.2.2. Test migracji (test „gojenia rany”)

Test „gojenia rany” pozwala na ocenę potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych w oparciu o ich aktywność migracyjną i proliferacyjną. Metoda polega na wykonaniu rysy w hodowli jednowarstwowej a następnie pomiarze jej zarastania. W celu wykluczenia mechanicznego uszkodzenia komórek, rysę wykonano przy użyciu dedykowanych do eksperymentu samoprzylepnych dwukomorowych insertów wykonanych z biokompatybilnego silikonu (Ibidi GmbH; Niemcy).

Dwukomorowe inserty o wymiarach 8.4 x 8.4 x 5 mm i powierzchni całkowitej 0,82 cm² umieszczono w sterylnej płytce 6 dołkowej (1 insert/dołek). Do każdej komory insertu wprowadzono 70 µl zawiesiny komórek o gęstości 2×10^5 . Po osiągnięciu pełnej konfluentności hodowli, inserty usunięto i uzupełniono pożywką hodowlaną do objętości całkowitej 2 ml. Według danych producenta, między komorami uzyskano szczelinę o szerokości 500 µm. W celu uzyskania warunków kokultury, w każdym dołku umieszczono insert membranowy z komórkami THP-1. Komórki poddano 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen o stężeniu 10 µM.



Rycina 16. Przygotowanie próbki dla testu „gojenia rany” z użyciem dwukomorowego insertu silikonowego Ibidi (A; wg. materiałów instruktażowych producenta Ibidi GmbH; rysunek zmodyfikowany). Płytką 6-dołkową z wysianymi komórkami nowotworowymi sutka w insertach Ibidi (zdjęcie własne; fot. Karol Rogowski).

Po upływie 24 godzin, próby poddano analizie mikroskopowej z wykorzystaniem odwróconego mikroskopu kontrastowo-fazowego Leica DM IL Led. Sporządzono dokumentację fotograficzną szczeliny dla 3 losowo wybranych sektorów próby. Rozmiar szczeliny analizowano za pomocą programu ImageJ.

3.3.3. Badanie wpływu tamoksyfenu na aktywność immunologiczną komórek THP-1

Status immunologiczny badano w oparciu o profil wybranych pro- i przeciwzapalnych cytokin uwalnianych z monocytów linii THP-1 w monokulturze i kokulturach oraz markery różnicowania monocytów w makrofagi o fenotypie prozapalnym M1 i przeciwzapalnym M2. Zdolność komórek THP-1 do różnicowania w makrofagi zbadano poprzez inkubację tych komórek z mirystynianem-13-octanem forbolu (PMA) w dawce 100ng/ml przez 24, 48 i 72 godziny.

3.3.3.1. Oznaczenie stężenia cytokin

Stężenie cytokin IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF α oznaczono przy pomocy zestawu Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines Kit (Becton Dickinson, USA). Zestaw wykorzystuje kulki pokryte specyficznymi przeciwciałami, które służą jako powierzchnia wychwytyjąca cytokiny. Materiał do badań stanowiły supernatanty z hodowli komórkowej, które otrzymano przez wirowanie poszczególnych próbek. Oznaczenie wykonano zgodnie z instrukcją producenta zestawu. W pierwszym etapie oznaczenia przygotowano seryjne rozcieńczenia wzorca rozpuszczonego w buforze do rozcieńczeń (Assay Diluent). Następnie sporządzono mieszaninę kulek sprzęgniętych z przeciwciałami anty-IL- β ; IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF- α . Na każdą badaną próbkę przeznaczono 10 μ l roztworu podstawowego każdego rodzaju kulek. Do cytometrycznych probówek pomiarowych dodano odpowiednio 50 μ l mieszaniny kulek, 50 μ l roztworu wzorca lub próby badanej oraz 50 μ l odczynnika detekcyjnego Human Inflammatory Cytokine PE Detection Reagent. Próby poddano 3 godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Następnie do probówek pomiarowych dodano 1 ml buforu płuczącego i poddano wirowaniu na wirówce laboratoryjnej z prędkością 200 rcf przez 5 minut. Kulki zawieszono w 300 μ l buforu płuczącego i poddano pomiarowi na cytometrze przepływowym FACS CantoII (Becton Dickinson, USA). Uzyskane wyniki analizowano za pomocą oprogramowania FCAP Array V2.0.2 (Becton Dickinson, USA).

3.3.3.2. Analiza markerów różnicowania monocytów THP-1 i fenotypu immunologicznego

Do oznaczenia ekspresji markerów charakterystycznych dla makrofagów i ich fenotypu immunologicznego zastosowano metodę cytometrii przepływowej w oparciu o swoiste przeciwciała. Dla wykorzystanych w badaniu przeciwciał wykonano właściwe kontrole izotypowe poprzez inkubację komórek kontrolnych THP-1 z immunoglobulinami klasy IgG skoniugowanymi z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC). Po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen, komórki THP-1 odwirowano (1500 obr/min; 4°C; 5 minut), a uzyskany osad zawieszono w 4% roztworze paraformaldehydu (200 μ l/10⁵ komórek) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Komórki przepłukano 1 ml PBS w temperaturze pokojowej i odwirowano (1500 obr/min; 4°C; 5 minut). Uzyskany osad zawieszono w 100 μ l 0,1% roztworu Triton-X100 i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie komórki przepłukano 1 ml PBS i ponownie odwirowano (1500 obr/min; 4°C; 5 minut). Uzyskany osad zawieszono w 250 μ l PBS i poddano znakowaniu przeciwciałami

monoklonalnymi w stężeniach zalecanych przez producenta. W celu oznaczenia wewnątrzkomórkowej ekspresji CD68, komórki THP-1 inkubowano bez dostępu światła w temperaturze pokojowej przez 30 minut z przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko CD68 i sprzęgniętym z FITC. Stężenie przeciwciała w każdej próbie badanej wynosiło $0,125 \mu\text{g}/10^5$ komórek. Komórki przepłukano 1 ml PBS, odwirowano (1500 obr/min; 4°C ; 5 minut) i zawieszono w 500 μl PBS. W celu identyfikacji arginazy-1 w badanych próbach, komórki inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko arginazie-1 o stężeniu $2,6 \mu\text{g}/\text{ml}$ przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Komórki odwirowano (1500 obr/min; 4°C ; 5 minut) i zawieszono w 250 μl PBS a następnie inkubowano w zaciemnieniu w temperaturze pokojowej przez 30 minut z przeciwciałem drugorzędowym zawierającym FITC jako fluorofor. Następnie komórki ponownie odwirowano (1500 obr/min; 4°C ; 5 minut) i zawieszono w 500 μl PBS. Analizę przeprowadzono przy użyciu cytometrów przepływowych FACS Lyric i FACS CantoII.

3.3.4. Badanie wpływu tamoksyfenu na ekspresję sparowanych receptorów Siglec-5/14 i elementów wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych

Wpływ tamoksyfenu na proces nadzoru immunologicznego badano w oparciu o cytometryczny pomiar ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 na powierzchni komórek THP-1 w warunkach monokultury i kokultury. Do oceny zmian w poziomie ekspresji genów SIGLEC5, SIGLEC14, SHP1 (PTPN6), SHP2 (PTPN11), DAP12 (TYROBP) zastosowano reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real Time PCR) z użyciem specyficznych par starterów.

3.3.4.1. Oznaczenie ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 metodą cytometrii przepływowej

W badaniu wykorzystano komercyjnie dostępne przeciwciało monoklonalne wiążące zewnątrzkomórkową domenę sparowanych receptorów Siglec-5/14. Po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen, komórki THP-1 odwirowano (1500 obr/min; 4°C ; 5 minut), a uzyskany osad zawieszono w 4% roztworze paraformaldehydu ($200 \mu\text{l}/10^5$ komórek) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Komórki przepłukano 1 ml PBS w temperaturze pokojowej i odwirowano (1500 obr/min; 4°C ; 5 minut), a uzyskany osad zawieszono w 250 μl PBS i poddano znakowaniu przeciwciałem skoniugowanym z FITC. Stężenie przeciwciała w każdej próbie badanej wynosiło $5 \mu\text{g}/\text{ml}$. Próby wraz z właściwymi kontrolami izotypowymi inkubowano bez dostępu światła w temperaturze pokojowej przez 30

minut. Następnie komórki przepłukano 1 ml PBS, odwirowano (1500 obr/min; 4°C; 5 minut) i zawieszono w 500 µl PBS. Analizę przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego FACS CantoII.

3.3.4.2. Badanie poziomu ekspresji genów metodą Real-time PCR

Po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen, komórki THP-1 odwirowano (1500 obr/min; 4°C; 5 minut), przepłukano zimnym PBS i przeprowadzono izolację całkowitego RNA przy użyciu gotowego zestawu RNasy Mini Kit według instrukcji producenta. Stężenie wyizolowanych próbek RNA mierzono na mikrospektrofotometrze UV-ViS NanoDrop 2000, a także oceniano ich czystość od białka w oparciu o stosunek absorpcji przy długości fal 260/280 nm.

W kolejnym etapie badania przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji, której celem było otrzymanie stabilnego kwasu nukleinowego cDNA. Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano gotowy zestaw SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR zgodnie z instrukcją producenta. Przed przystąpieniem do procedury próbki RNA rozcieńczono wodą uzyskując ostatecznie stężenie 1 µg/µl RNA w roztworze. Reakcję odwróconej transkrypcji przeprowadzono przy użyciu termocyklera PTC 200. Do sporządzenia mieszaniny reakcyjnej użyto: 1 µl roztworu RNA wyizolowanego z komórek THP-1, 1 µl roztworu dNTP, 1 µl starterów Oligo_dT i wodę wolną od RNA-az (RNA-se free). Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 µl. Zawartość próbek reakcyjnych inkubowano w temperaturze 65°C przez 5 minut, a następnie próbki umieszczano w lodzie na 1 minutę. Do każdej próbki RNA dodano mieszaninę RT Mix, która zawierała 2 µl buforu 10X RT, 4 µl 25 mM roztworu MgCl₂, 2 µl 0,1M roztworu DTT i 1 µl roztworu RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor. Próby inkubowano w 25°C przez 2 minuty, a następnie do każdej do każdej próbki RNA dodano 1µl (50 jednostek) roztworu SuperScript™ II RT. Mieszaninę ponownie inkubowano w temperaturze 25°C przez 5 minut. Po tym czasie próby poddano kolejno inkubacji w temperaturze 42°C przez 50 minut i 72°C przez 15 minut. Probówki reakcyjne mieszaniną reakcyjną schłodzono w lodzie, a następnie dodano 1 µl roztworu Rnase H i poddano końcowej inkubacji w temperaturze 37°C przez 20 minut. Probówki reakcyjne z otrzymanym cDNA uzupełniono 150 µl wodą wolną od RNA-az i przechowywano w temperaturze -20°C.

Do ilościowej oceny poziomu ekspresji genów SIGLEC5, SIGLEC14, SHP1 (PTPN6), SHP2 (PTPN11) i DAP12 (TYROBP) użyto systemu detekcji fluorescencji Real Time PCR CFX 96 Connect. W reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym wykorzystano gotowe

startery firmy Qiagen o tej samej temperaturze przyłączania. Sekwencje użytych starterów są objęte tajemnicą handlową firmy Qiagen, ale były zgodne bazą danych Gene Bank.

W badaniu użyto następujących starterów:

- Dla genu SIGLEC5: HS_SIGLEC5_1_SG QuantiTect Primer Assay
- Dla genu SIGLEC14: HS_SIGLEC14_1_SG QuantiTect Primer Assay
- Dla genu DAP12: HS_TYROBP_1_SG QuantiTect Primer Assay
- Dla genu SHP1: HS_PTPN6_1_SG QuantiTect Primer Assay
- Dla genu SHP2: HS_PTPN11_1_SG QuantiTect Primer Assay

Do normalizacji badań wykorzystano gen referencyjny GAPDH z rodziny „housekeeping gene” o stałym poziomie ekspresji w warunkach eksperymentu opierając się na komercyjnym starterze firmy Qiagen: HS_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay.

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono z wykorzystaniem cDNA pozyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji oraz zestawu QuantiTect™ SYBR Green PCR Master Mix. Według danych producenta mieszanina QuantiTect™ SYBR Green PCR Master Mix zawierała polimerazę DNA HotStart-*Taq*, mieszaninę dNTP, barwnik fluorescencyjny SYBR Green I oraz bufor reakcyjny.

Każda próbówka reakcyjna zawierała: 5 µl cDNA uzyskanego w wyniku reakcji odwróconej transkrypcji, 10 µl roztworu QuantiTect™ SYBR Green PCR Master Mix oraz 2 µl startera badanego genu. Dla każdego genu oznaczanego w poszczególnej próbie badanej reakcję Real-Time PCR wykonano w dwóch powtórzeniach.

W badaniu zastosowano następujące warunki reakcji amplifikacji:

- | | |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 1. wstępna aktywacja polimerazy HotStart- <i>Taq</i> | 95 ⁰ C- 15 min |
| 2. denaturacja nici cDNA | 95 ⁰ C - 30 s |
| 3. wiązanie starterów | 55 ⁰ C - 15s |
| 4. synteza nici DNA | 72 ⁰ C - 30s |
| 5. czytanie płytki | |
| 6. powtórzenie cyklu denaturacja - synteza nici DNA | 39x |
| 7. krzywa topnienia – odczytywanie temperatury denaturacji produktów | co 2 ⁰ C i 2s |
| 8. zakończenie reakcji | |

Produkty reakcji amplifikacji badanych genów oceniano na podstawie krzywej dysocjacji i temperatur mięknienia poszczególnych produktów wyznaczonych przez aparat pomiarowy. Poziom ekspresji genów określono na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczonej dla serii rozcieńczeń cDNA pochodzącego z komórek kontrolnych THP-1. Wyniki względnej ekspresji

otrzymano w postaci wartości C_T - threshold cycle - cyklu reakcji PCR, w którym nastąpił maksymalny wzrost fluorescencji, wyznaczonym w punkcie przecięcia z linią threshold, której poziom wyznaczany jest za pomocą krzywej wzorcowej.

3.3.5. Ocena wiązania białek fuzyjnych Siglec-5 Fc i Siglec-14 Fc do komórek nowotworowych MCF-7 i MDA-MB-231.

W badaniu wykorzystano białka fuzyjne Fc, których struktura składa się z domeny Fc IgG genetycznie połączonej białkiem będącym przedmiotem zainteresowania o zachowanej natywnej aktywności biologicznej.

Po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen w warunkach monokultury i kokultury, komórki MCF-7 i MDA-MB-231 zebrano z płytek hodowlanych za pomocą sterylnego skrobaka i odwirowano (1500 obr/min; 4°C; 5 minut), a uzyskany osad zawieszono w 250 μ l PBS. Do każdej próby badanej dodano białka fuzyjne Siglec-5/Fc lub Siglec-14/Fc w stężeniu 5 μ g/ml i inkubowano w temperaturze 37°C przez 60 minut. Następnie, komórki przepłukano 1 ml PBS, odwirowano (1500 obr/min; 4°C; 5 minut) i znakowano przeciwciałem drugorzędowym o właściwościach fluorescencyjnych. Próby inkubowano bez dostępu światła w temperaturze pokojowej przez 30 minut, a następnie przepłukano 1 ml PBS, odwirowano (1500 obr/min; 4°C; 5 minut) i zawieszono w 500 μ l PBS. Dla badanych prób przygotowano właściwe kontrole izotypowe. Analizę przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego FACS CantoII.

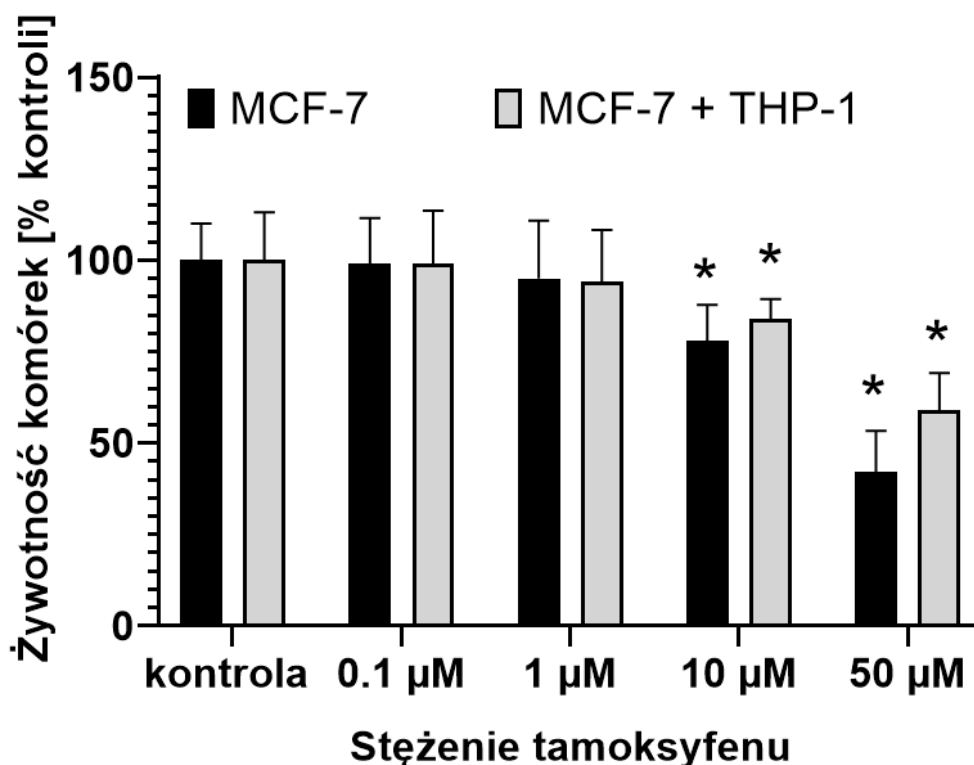
3.4. Analiza statystyczna

Dane przedstawione w postaci wykresów są średnią \pm SD z 3-5 eksperymentów. Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o pakiet statystyczny InStat stosując jednoczynnikowy test ANOVA z testem *post hoc* Bonferoni. Za różnice istotne statystycznie uznano wyniki, gdzie wartość p była mniejsza od 0,05.

IV. WYNIKI

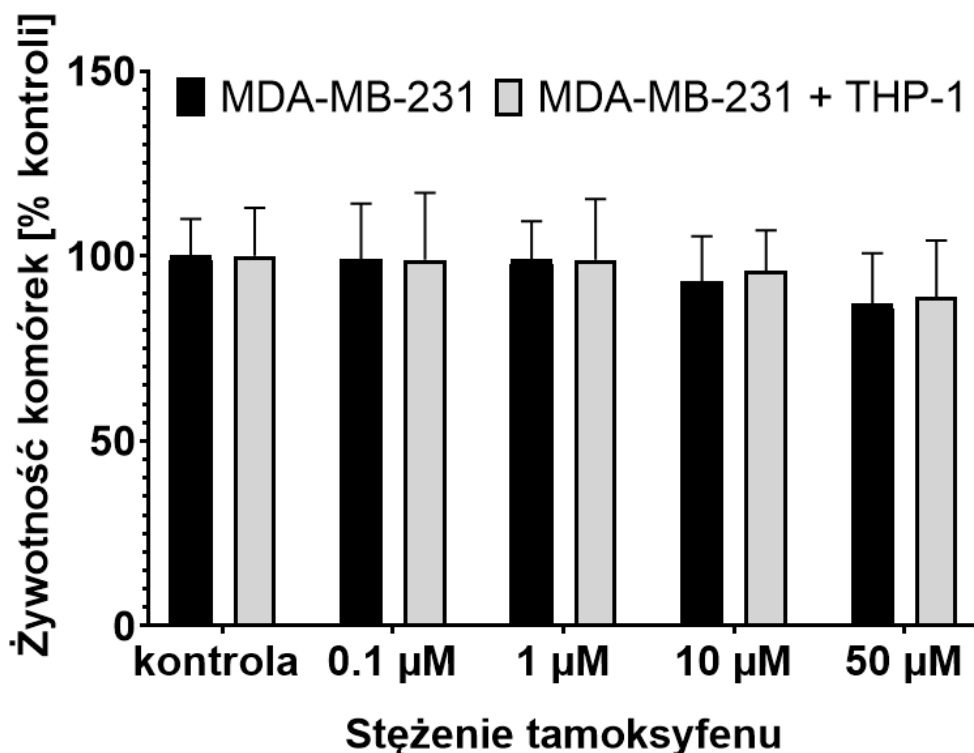
4.1. Wpływ tamoksyfenu na żywotność komórek raka sutka linii MCF-7 i MDA-MB-231 oraz monocytów linii THP-1 hodowanych w warunkach monokultury i kokultury.

Ocena wpływu 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen na przeżywalność komórek raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 oraz monocytów THP-1 została wykonana w oparciu o test MTT. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia tamoksyfenu w zakresie 0,1-50 μM spada przeżywalność badanych komórek. Analiza żywotności komórek raka sutka linii MCF-7 i MDA-MB-231 hodowanych w warunkach monokultury lub w obecności monocytów THP-1 wykazała, że narażenie na tamoksyfen w zakresie stężeń 0,1 - 1 μM powoduje nieistotną statystycznie redukcję przeżywalności w granicach od 1% do 6%. Narażenie na tamoksyfen w stężeniach 10 i 50 μM powodowało istotny statystycznie spadek żywotności komórek nowotworowych linii MCF-7, zarówno w warunkach monokultury i kokultury (Rycina 17).



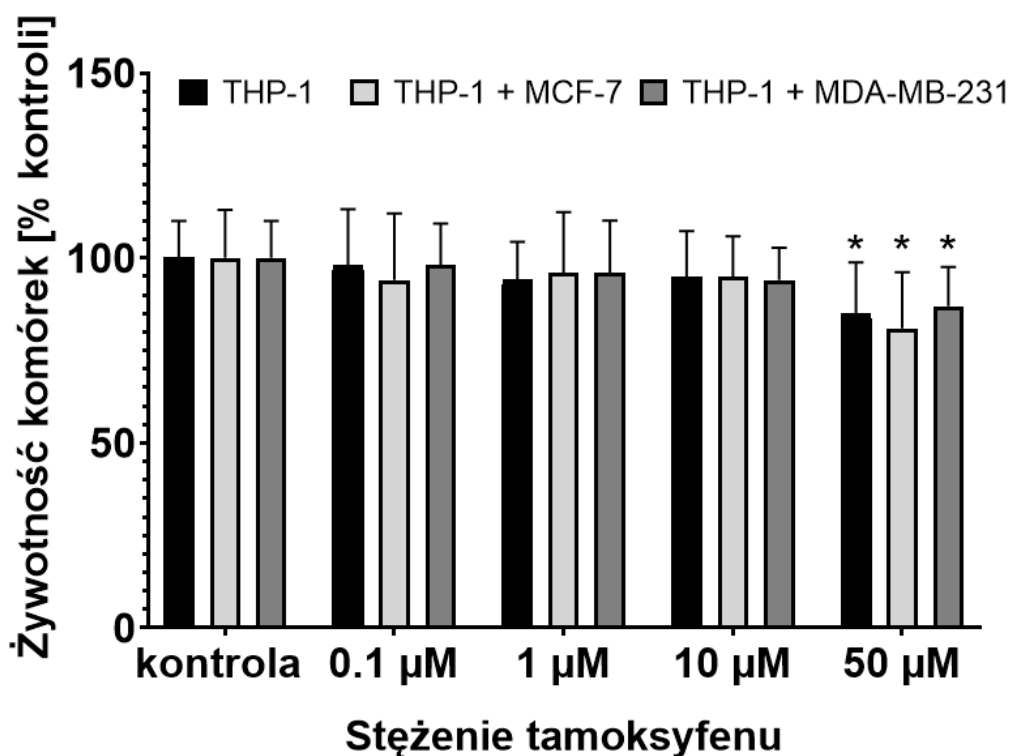
Rycina 17. Analiza przeżywalności komórek raka piersi linii MCF-7 po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen w oparciu o test redukcji MTT. Wyniki przedstawiono jako % kontroli i stanowią średnią \pm SD z trzech niezależnych oznaczeń. * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii MCF-7.

W warunkach monokultury, żywotność komórek linii MCF-7 uległa redukcji o 22% dla stężenia 10 μM i 58% dla stężenia 50 μM . W warunkach kokultury żywotność komórek traktowanych tamoksyfenem w stężeniu 10 μM i 50 μM spadła odpowiednio o 16% i 41%. W populacji MDA-MB-231 zanotowano zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen w stężeniu 10 μM i 50 μM o odpowiednio 7% i 13% w monokulturze oraz 4% i 11% w kokulturze (Rycina 18). Obserwowane zmiany były nieistotne statystycznie w porównaniu do komórek nietraktowanych tamoksyfenem.



Rycina 18. Analiza przeżywalności komórek raka piersi linii MDA-MB-231 po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen w oparciu o test redukcji MTT. Wyniki przedstawiono jako % kontroli i stanowią średnią \pm SD z trzech niezależnych oznaczeń.

Wyniki przedstawione na Rycinie 19 obrazują wpływ tamoksyfenu na przeżywalność komórek linii THP-1 utrzymywanych w warunkach monokultury oraz hodowanych w obecności komórek nowotworowych sutka MCF-7 lub MDA-MB-231. Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała, że narażenie komórek THP-1 na tamoksyfen w zakresie stężeń 0,1 - 10 μM powoduje nieistotną statystycznie redukcję ich przeżywalności w granicach od 2% do 6%. Znamienne spadki żywotności komórek THP-1 w stosunku do komórek nietraktowanych zanotowano w monokulturach i kokulturach narażonych na 50 μM tamoksyfenu.



Rycina 19. Analiza przeżywalności monocytów linii THP-1 po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen w oparciu o test redukcji MTT. Wyniki przedstawiono jako % kontroli i stanowią średnią \pm SD z trzech niezależnych oznaczeń. * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii THP-1.

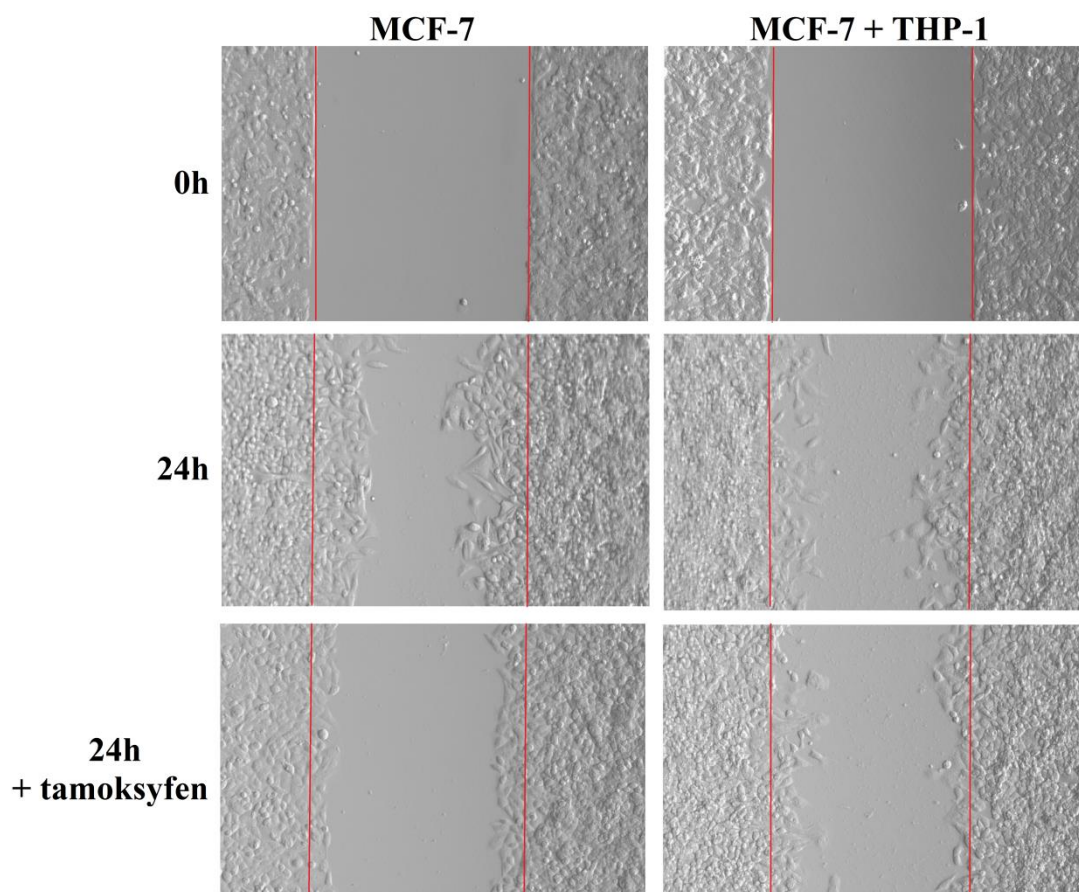
Do dalszych badań nad immunomodulacyjnym działaniem tamoksyfenu na komórki THP-1 wybrano stężenie 10 μ M.

4.2. Ocena wpływu tamoksyfenu na potencjał migracyjny komórek raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 w warunkach monokultury lub w kokulturze z monocytami linii THP-1.

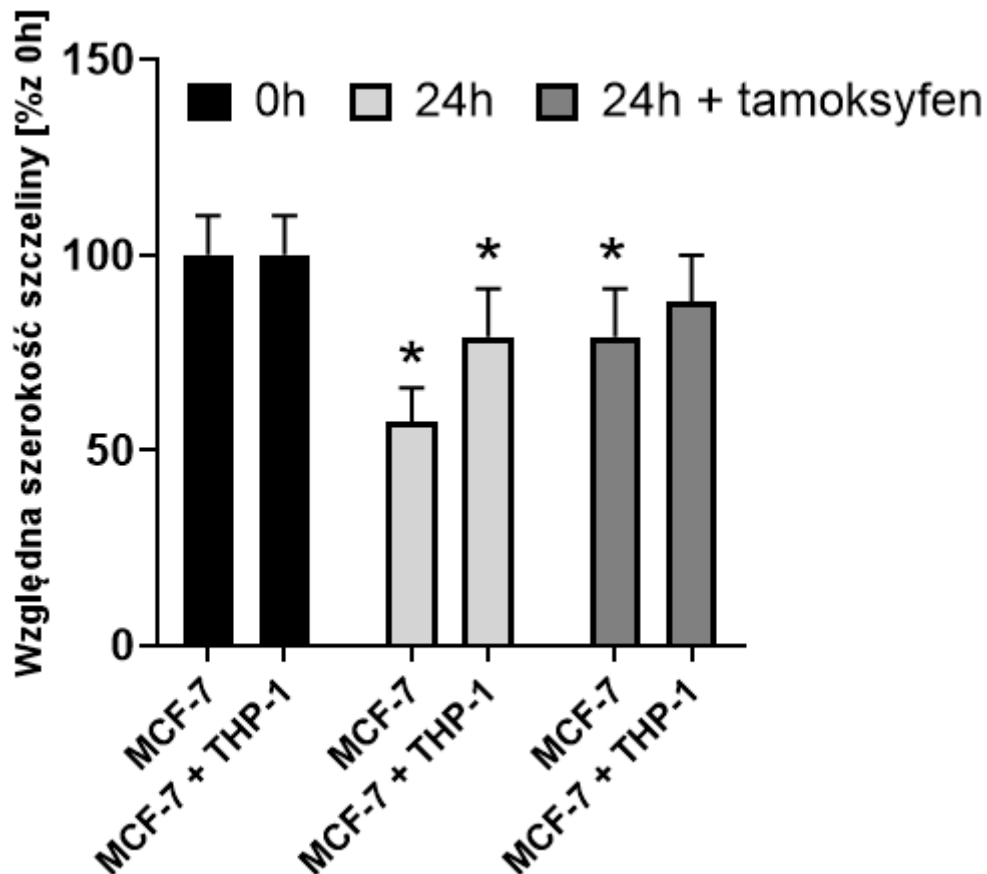
W celu potwierdzenia danych uzyskanych w teście redukcji MTT, oceniono wpływ tamoksyfenu na aktywność biologiczną komórek raka sutka poprzez analizę zdolności migracji i proliferacji komórek w teście „gojenia rany”. Potencjał migracyjny mierzono w oparciu o pomiar pola powierzchni między dwiema krawędziami konfluentnej hodowli komórek nowotworowych sutka w warunkach monokultury i kokultury po ekspozycji na 10 μ M tamoksyfenu.

Wyniki eksperymentu przedstawiono za pomocą zdjęć wykonanych w momencie wykonania „rany” oraz po 24 godzinach od rozpoczęcia badania i ekspozycji na tamoksyfen (Ryciny 20 i 22) oraz wykresach sporządzonych w oparciu o wyniki pomiaru powierzchni (Ryciny 21 i 23). W monokulturach komórek linii MCF-7 i ich kokulturach z monocytami linii THP-1 pole

powierzchni szczeliny zmniejszyło się znamienne odpowiednio o 43% i 21% w ciągu 24 godzin od wykonania „rany”. Po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen zanotowano zmniejszenie pola powierzchni wolnej od komórek o 21% w monokulturze i 12 w kokulturze (Ryciny 20, 21).

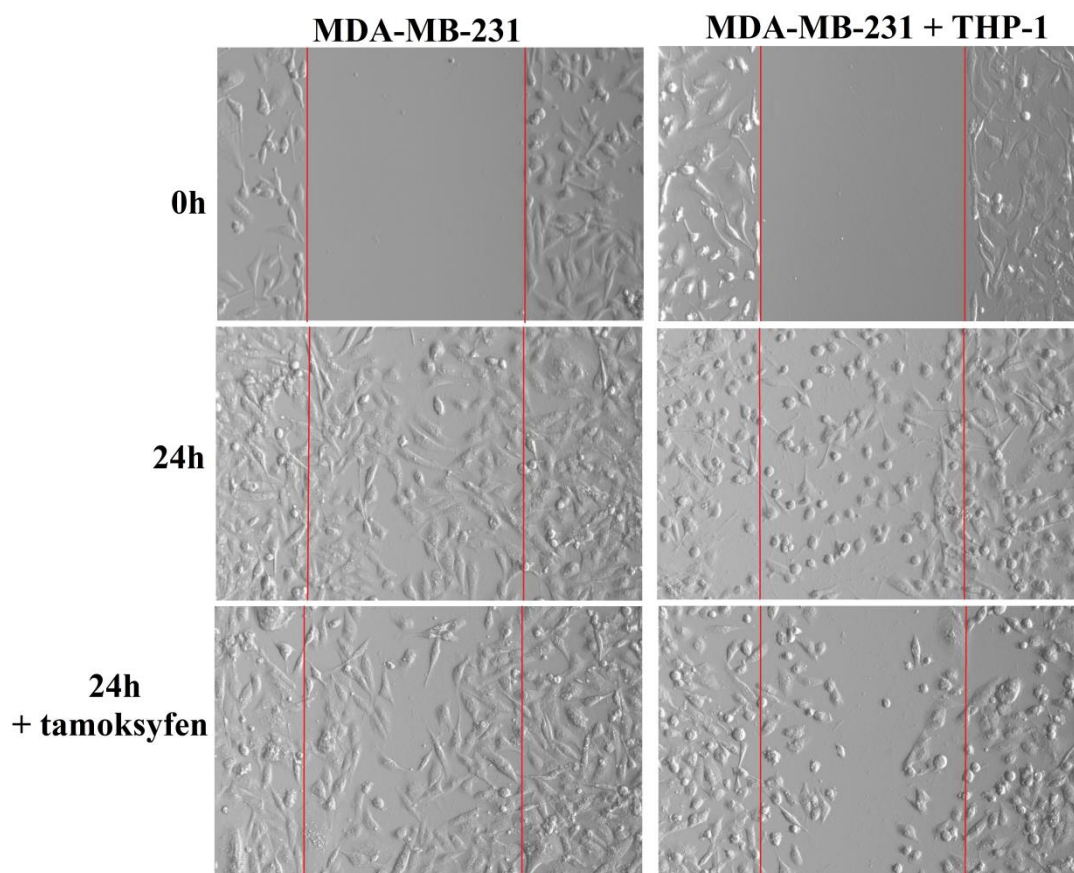


Rycina 20. Wpływ tamoksyfenu na potencjał migracyjny komórek MCF-7. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające proces „gojenia rany” w monokulturze komórek MCF-7 lub w kokulturze z monocytami linii THP-1.

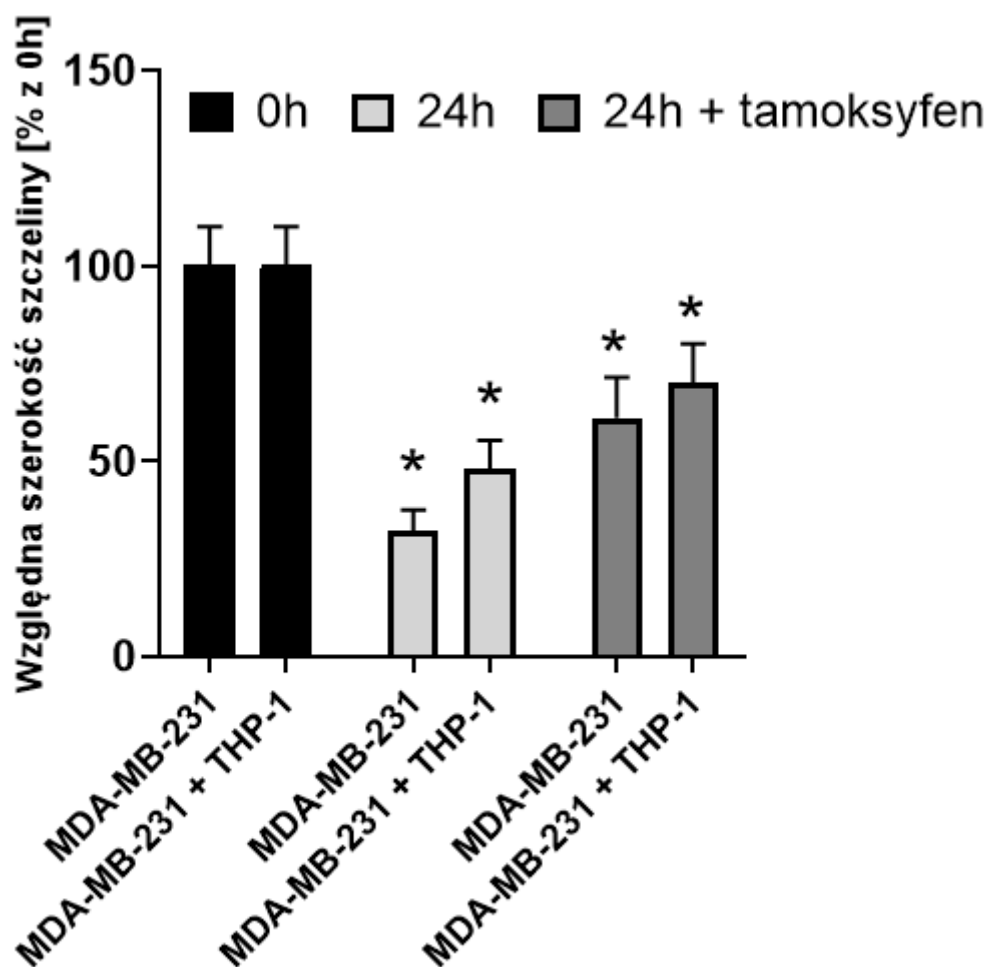


Rycina 21. Wpływ tamoksyfenu na potencjał migracyjny komórek MCF-7. Analiza pola powierzchni „rany” w trakcie 24 godzinowego doświadczenia. Wyniki przedstawiono jako % kontroli i stanowią średnią \pm SD z trzech niezależnych oznaczeń. * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii MCF-7 w czasie 0h.

Ryciny 22 i 23 przedstawiają aktywność migracyjną i proliferacyjną komórek raka sutka linii MDA-MB-231. Pomiar powierzchni wolnej od komórek wykazał, że w monokulturach komórek linii MCF-7 i ich kokulturach z monocytami linii THP-1 pole powierzchni szczeliny zmniejszyło się znamienne odpowiednio o 68% i 52% w ciągu 24 godzin od wykonania „rany”. W populacji MDA-MB-231 narażonej na 24 godzinną ekspozycję na 10 μ M tamoksyfenu zanotowano istotne statystycznie zmniejszenie pola powierzchni „rany” odpowiednio o 39% w monokulturze oraz 30% w kokulturze.



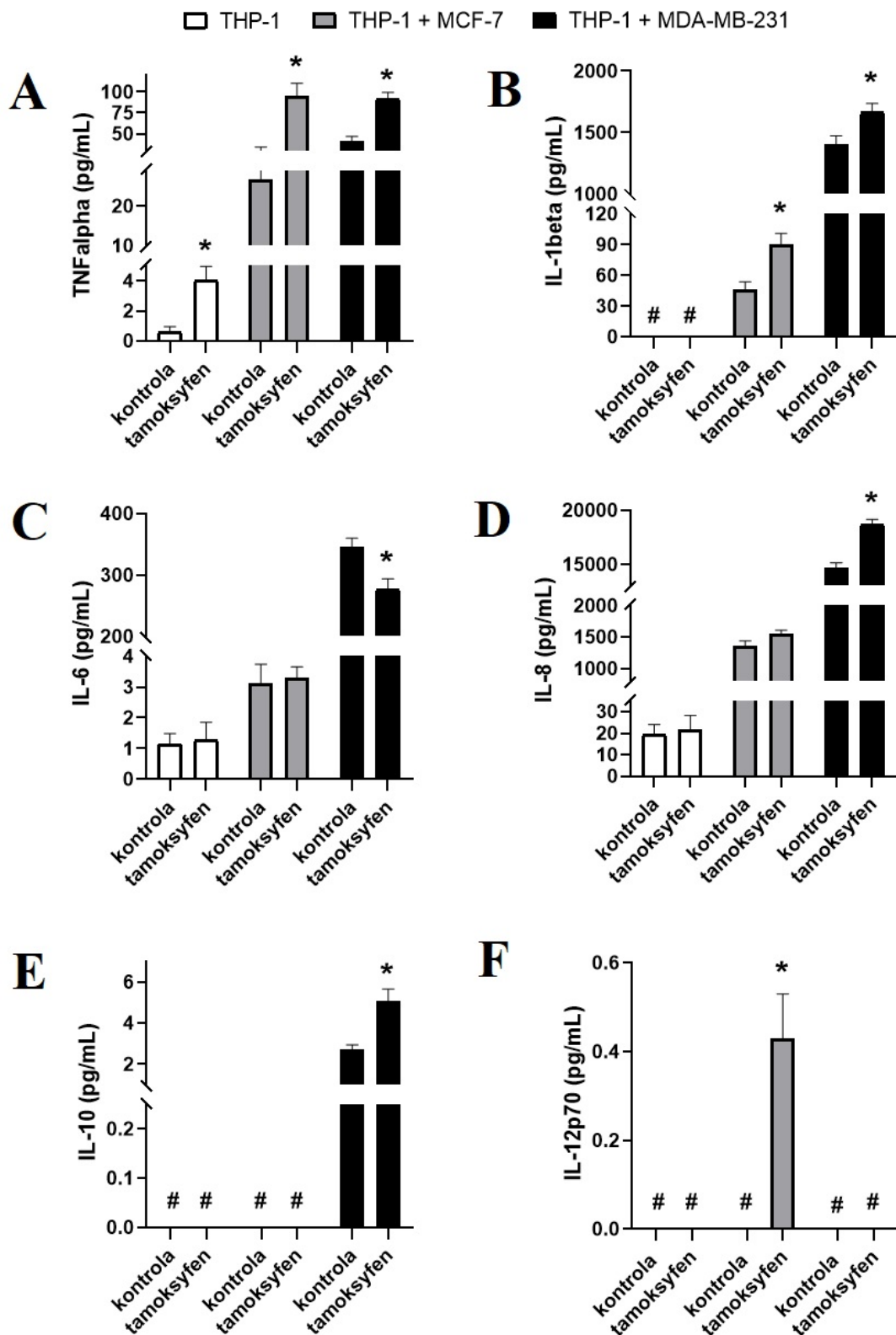
Rycina 22. Wpływ tamoksyfenu na potencjał migracyjny komórek MDA-MB-231. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające proces „gojenie rany” w monokulturze komórek MCF-7 lub w kokulturze z monocytami linii THP-1.



Rycina 23. Wpływ tamoksyfenu na potencjał migracyjny komórek MDA-MB-231. Analiza pola powierzchni „rany” w trakcie 24 godzinowego doświadczenia. Wyniki przedstawiono jako % kontroli i stanowią średnią \pm SD z trzech niezależnych oznaczeń. * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii MCF-7 w czasie 0h.

4.3. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję cytokin w monokulturach monocytów linii THP-1 i kokulturach z komórkami raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231.

Immunomodulacyjny wpływ tamoksyfenu oszacowano na podstawie cytometrycznej analizy stężeń wybranych cytokin w monokulturach monocytów linii THP-1 i kokulturach z komórkami raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231. Porównanie analizowanych poziomów TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 i IL-12p70, określanych jako ilość białka cytokinowego na mililitr supernatantu komórkowego, wykazało różnice między komórkami nietraktowanymi i traktowanymi tamoksyfenem. Średnie stężenia cytokin TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 i IL-12p70 w nadsączach monocytów THP-1 w badanych układach hodowli komórkowych przedstawia (Rycina 23;A-F).



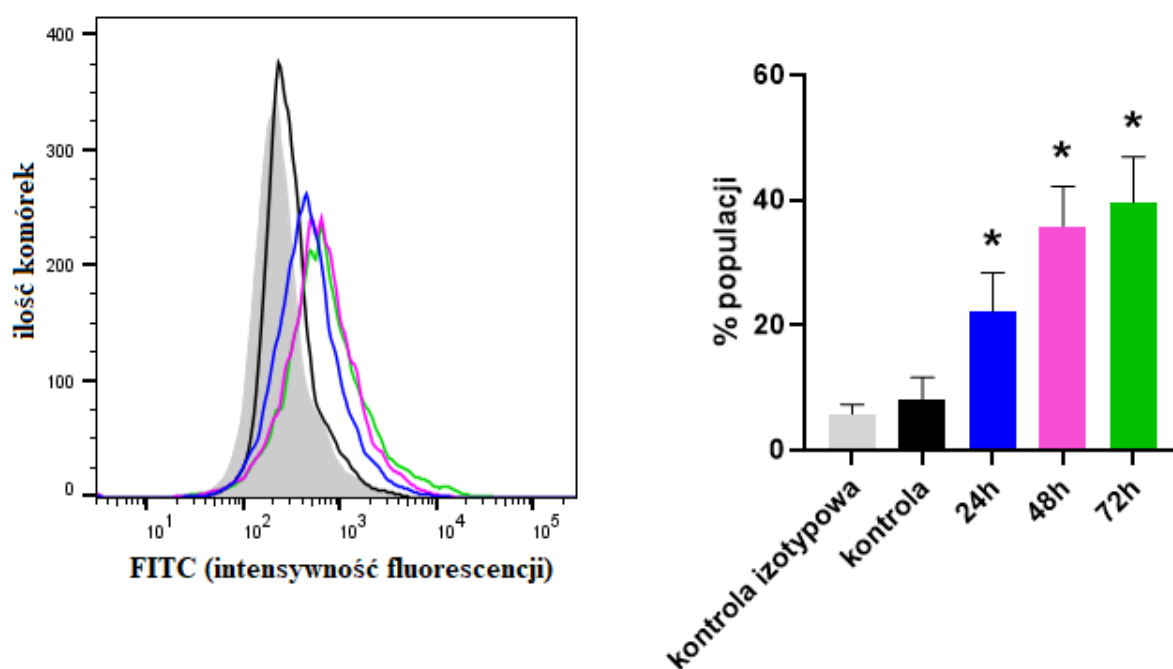
Rycina 24. Stężenie TNF α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-8 (D), IL-10 (E) i IL-12p70 (F) w monokulturach i kokulturach monocytów linii THP-1. Każda kolumna przedstawia średnią wartość stężenia z 3 niezależnych eksperymentów; *p < 0,05 – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych monocytów kontrolnych w odpowiednim układzie komórkowym; # - stężenie <0,01 pg/ml (poniżej progu oznaczalności).

W próbkach monocytów THP-1 hodowanych w monokulturze stwierdzono niższe poziomy TNF- α , IL-6 i IL-8 w porównaniu z ich stężeniami w próbkach uzyskanych z kokultur monocytów z komórkami MCF-7 lub MDA-MB-231. Jednocześnie, nie stwierdzono wydzielania IL-1 β , IL-10 i IL-12p70 w próbkach pochodzących z monokultury monocytów THP-1. W kokulturach komórkowych zaobserwowano wysokie poziomy wszystkich testowanych testowanych cytokin w grupach doświadczalnych z wyjątkiem IL-10 w kokulturze monocytów THP-1 z komórkami raka sutka linii MCF-7 i IL-12p70 w kokulturze monocytów THP-1 z komórkami raka sutka linii MDA-MB-231. Średnie stężenie TNF α (pg/ml) w nadsączach komórkowych uzyskanych z monokultury komórek THP-1 oraz kokultur z komórkami MCF-7 i MDA-MB-231 wynosiło odpowiednio: $0,62 \pm 0,32$; $26,7 \pm 7,5$ i $41,04 \pm 5,9$, a po 24 godzinnej ekspozycji na 10 μ M tamoksyfenu wzrosło odpowiednio do wartości: $4,06 \pm 0,68$; $95,21 \pm 14,8$ i $92,02 \pm 7,3$. Powyższe zmiany były istotne statystycznie ($p < 0,05$); Rycina 24A. Statystycznie wyższe stężenia IL-1 β (pg/ml) zanotowano w nadsączach komórkowych uzyskanych z kokultur monocytów THP-1 z komórkami MCF-7 oraz MDA-MB-231 po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen i wynosiły odpowiednio: $89,53 \pm 11,5$ vs. $46,06 \pm 7,06$ w grupie kontrolnej oraz $1669 \pm 68,9$ vs. $1399 \pm 74,10$ w grupie kontrolnej (Rycina 24B). Analiza statystyczna wykazała, że 24 godzinna ekspozycja komórek THP-1 na tamoksyfen w monokulturze i kokulturze z komórkami MCF-7 nie zmienia istotnie stężenia IL-6 i IL-8 w porównaniu do poziomu oznaczonego w próbach kontrolnych.

Średnie stężenie IL-6 (pg/ml) w nadsączu komórkowym uzyskanym z kokultury monocytów THP-1 z komórkami MDA-MB-231 wynosiło $345 \pm 14,8$ pg/ml i zmniejszyło się istotnie statystycznie po 24 godzinnej ekspozycji na 10 μ M tamoksyfenu do poziomu $278 \pm 15,85$ pg/ml (Rycina 24C). Przeciwny efekt zanotowano w przypadku oznaczenia stężenia IL-8. Statystycznie wyższe stężenie IL-8 (pg/ml) zanotowano w nadsączach komórkowych uzyskanych z kokultur monocytów THP-1 z komórkami MDA-MB-231 po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen (18768 ± 394 vs. 14667 ± 459 w grupie kontrolnej; Rycina 24D). Wyniki przedstawione na Rycinie 24E obrazują wpływ tamoksyfenu na produkcję i wydzielanie IL-10 w poszczególnych układach komórkowych. Średnie stężenie IL-10 (pg/ml) w nadsączu komórkowym uzyskanym z kokultury monocytów linii THP-1 z komórkami MDA-MB-231 po ekspozycji na 10 μ M tamoksyfenu wynosiło $5,07 \pm 0,59$ pg/ml i było statystycznie wyższe od poziomu w grupie kontrolnej ($2,71 \pm 0,23$ pg/ml). W zastosowanym modelu badawczym stężenie IL-12p70 zostało zmierzone tylko w nadsączu komórkowym uzyskanym z kokultury monocytów THP-1 z komórkami MCF-7 traktowanej 10 μ M tamoksyfenu przez 24 godziny i wynosiło $0,43 \pm 0,1$ pg/ml (Rycina 24F).

4.4. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję CD68 w monokulturach monocytów linii THP-1 i kokulturach z komórkami raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231.

W celu określenia zdolności monocytów linii THP-1 do różnicowania się w makrofagi, komórki poddano stymulacji mirystynianem-13-octanem forbolu w dawce 100 ng/ml przez 24, 48 i 72 godziny. W komórkach oznaczono ekspresję CD68 metodą cytometrii przepływowej.

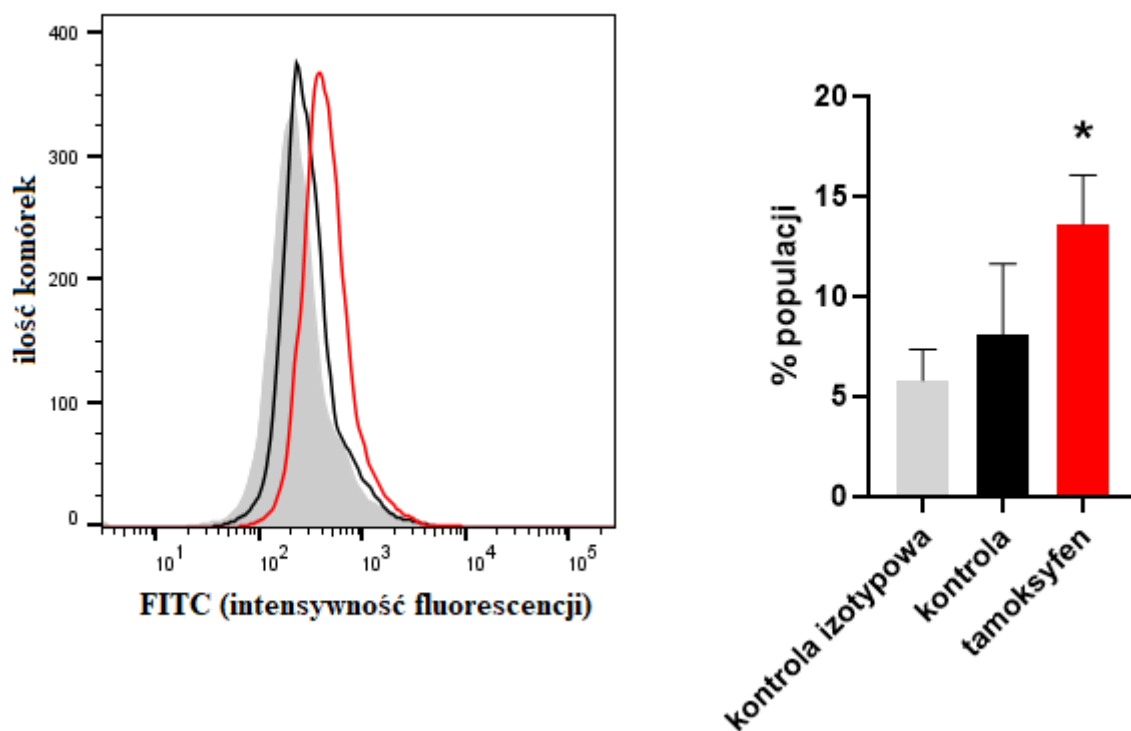


Rycina 25. Wpływ mirystynianu-13-octanu forbolu (PMA) na ekspresję CD68 w monocytach linii THP-1. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), PMA 24h (linia niebieska), PMA 48h (linia różowa) i PMA 72h (linia zielona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii THP-1.

Wyniki analizy cytometrycznej wykazały, że komórki z ekspresją CD68 stanowiły $8,07 \pm 3,55\%$ całkowitej populacji analizowanej jako grupa kontrolna. Po stymulacji za pomocą PMA przez 24, 48 i 72 godziny, komórki z ekspresją CD68 stanowiły odpowiednio $22,11 \pm 6,63\%$; $35,84 \pm 6,35\%$ i $39,6 \pm 7,25\%$ badanej populacji (Rycina 25).

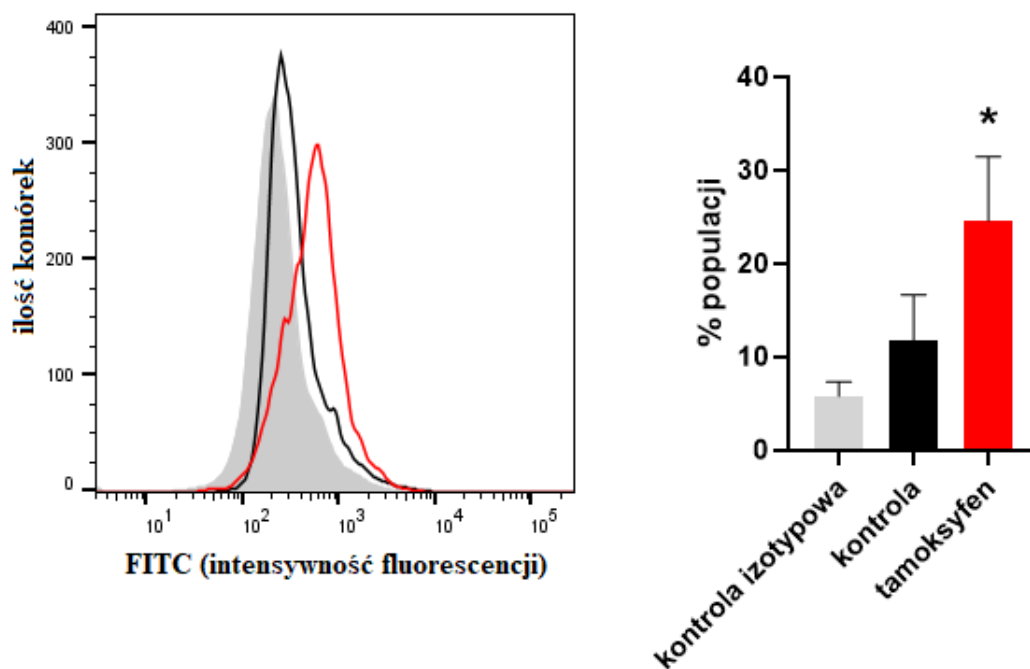
Na Rycinach 26, 27 i 28 przedstawiono zmiany ekspresji CD68 w odpowiedzi na $10 \mu\text{M}$ tamoksyfenu w poszczególnych układach komórkowych. W przypadku monokultury

monocytów linii THP-1 zastosowanie tamoksyfenu znamienne statystycznie zwiększyło ekspresję CD68 w $13,6 \pm 2,45\%$ populacji analizowanych komórek w porównaniu do populacji nietraktowanej ($8,07 \pm 3,55\%$).



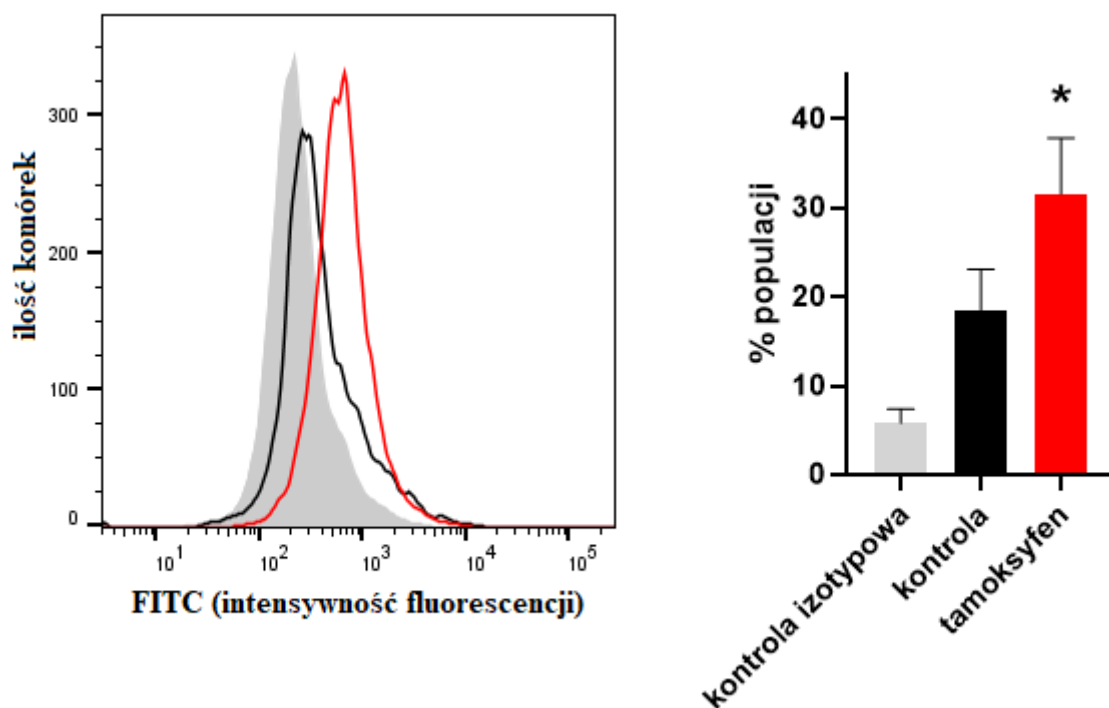
Rycina 26. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję CD68 w monocytach linii THP-1. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii THP-1.

W kokulturze monocytów linii THP-1 z komórkami raka sutka linii MCF-7 tamoksyfen indukował ponad dwukrotny wzrost ekspresji CD68. W porównaniu do grupy kontrolnej ilość komórek z ekspresją CD68 wzrosła z $11,79 \pm 4,85\%$ w grupie kontrolnej do $24,59 \pm 6,27\%$ w populacji traktowanej tamoksyfenem.



Rycina 27. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję CD68 w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka piersi MCF-7. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii THP-1.

Najwyższy poziom ekspresji CD68 zanotowano w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka sutka linii MDA-MB-231. Wyniki analizy cytometrycznej wykazały, że w tym układzie komórkowym monocyty z ekspresją CD68 stanowiły $18,52 \pm 4,55\%$ populacji komórek kontrolnych, podczas gdy 24 godzinna ekspozycja na tamoksyfen zwiększała ekspresję CD68 do $31,56 \pm 6,25\%$ analizowanej populacji.

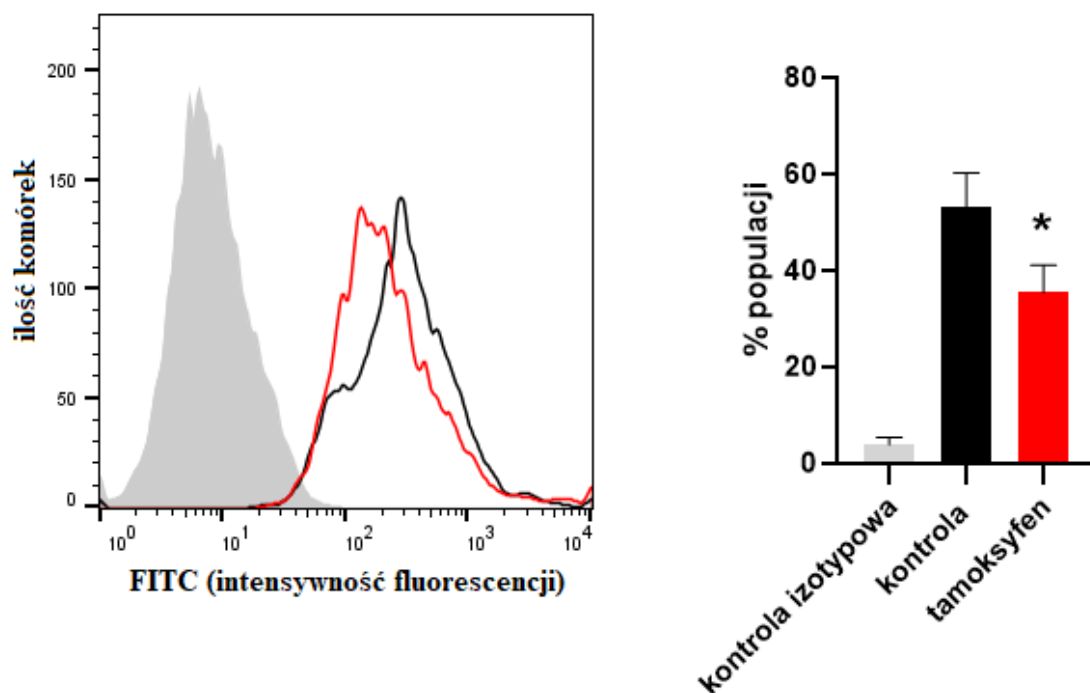


Rycina 28. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję CD68 w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka piersi MDA-MB-231. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii THP-1.

4.5. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję arginazy-1 w monokulturach monocytów linii THP-1 i kokulturach z komórkami raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231.

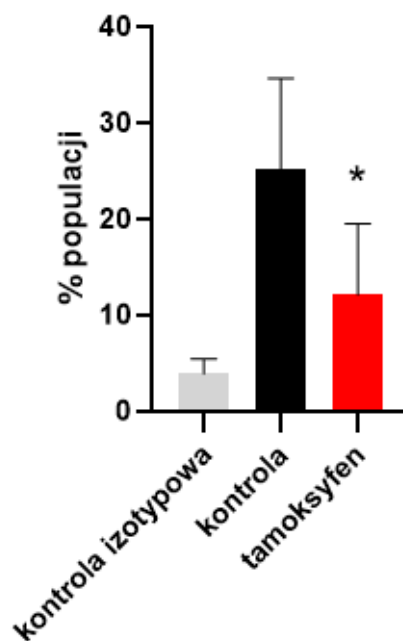
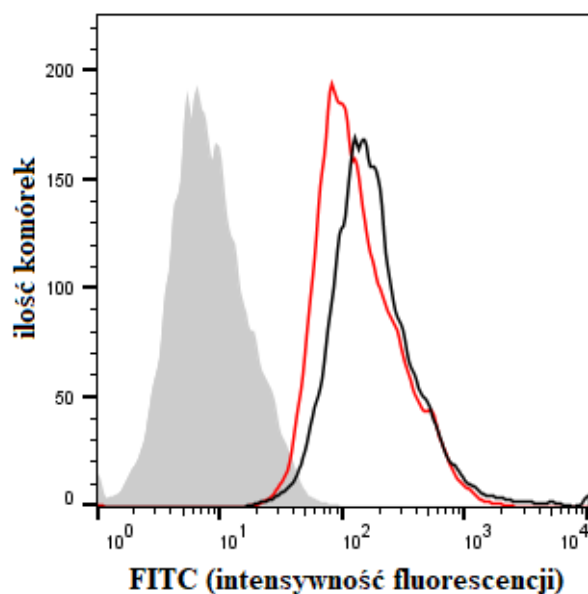
Biorąc pod uwagę zdolność monocytów do różnicowania się w makrofagi i ich zaangażowanie w formowanie mikrośrodowiska guza piersi, oceniliśmy ekspresję arginazy-1 jako markera fenotypu immunosupresyjnego M2. Na Rycinach 29, 30 i 31 przedstawiono zmiany wewnątrzkomórkowej ekspresji arginazy-1 w odpowiedzi na 10 μ M tamoksyfenu w poszczególnych układach komórkowych. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowane w badaniu przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko arginazie-1 potwierdziło wysoką ekspresję tego enzymu we wszystkich analizowanych próbach. Spośród testowanych układów komórkowych wysoki poziom ekspresji arginazy-1 zanotowano w niestymulowanych monocytach linii THP-1 hodowanych w warunkach monokultury lub w kokulturze z komórkami raka sutka linii MDA-MB-231. Ilość komórek wykazujących ekspresję arginazy-1 w tych grupach wynosiła odpowiednio $53 \pm 7,2\%$ i $72,4 \pm 12,2\%$. Najniższy poziom ekspresji arginazy-1 w grupie komórek kontrolnych obserwowano w monocytach linii THP-1

hodowanych w obecności komórek nowotworowych MCF-7, co stanowiło $25,1 \pm 9,5\%$ badanej populacji.

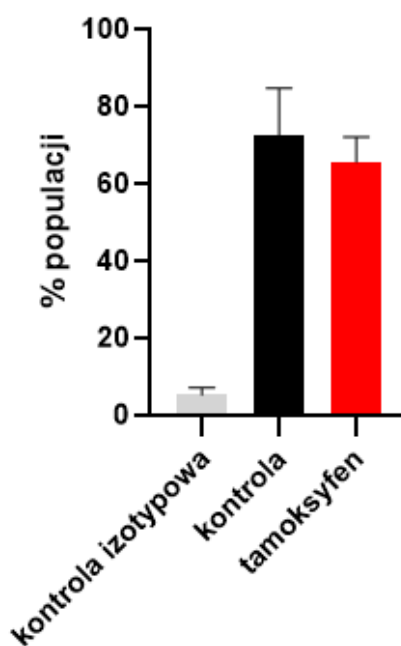
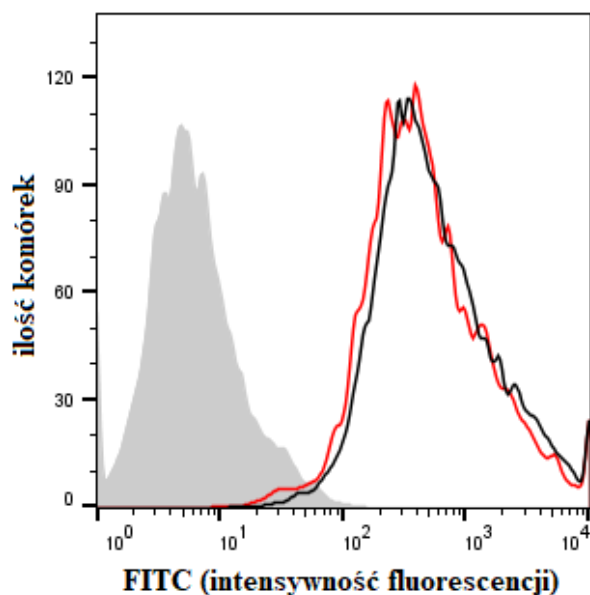


Rycina 29. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję arginazy-1 w monocytach linii THP-1. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii THP-1.

Stymulacja tamoksyfenem w stężeniu $10 \mu\text{M}$ przez 24 godziny skutkowałą spadkiem ekspresji arginazy-1 w badanych populacjach. W przypadku monokultury monocytów linii THP-1 zastosowanie tamoksyfenu zmniejszyło ekspresję arginazy-1 o 17%, a łączna ilość komórek wykazujących ekspresję enzymu stanowiła w $35,4 \pm 5,7\%$ populacji analizowanych komórek (Rycina 29). Podobną tendencję zaobserwowano w populacji monocytów THP-1 w warunkach kokultury z komórkami MCF-7. Po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen ilość komórek z ekspresją arginazy-1 była dwukrotnie niższa w porównaniu do grupy kontrolnej i stanowiła $12,1 \pm 7,4\%$ (Rycina 30). Opisane różnice były istotne statystycznie. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w populacji monocytów THP-1 w hodowli z komórkami MDA-MB-231 (Rycina 31).



Rycina 30. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję arginazy-1 w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka piersi MCF-7. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii THP-1.

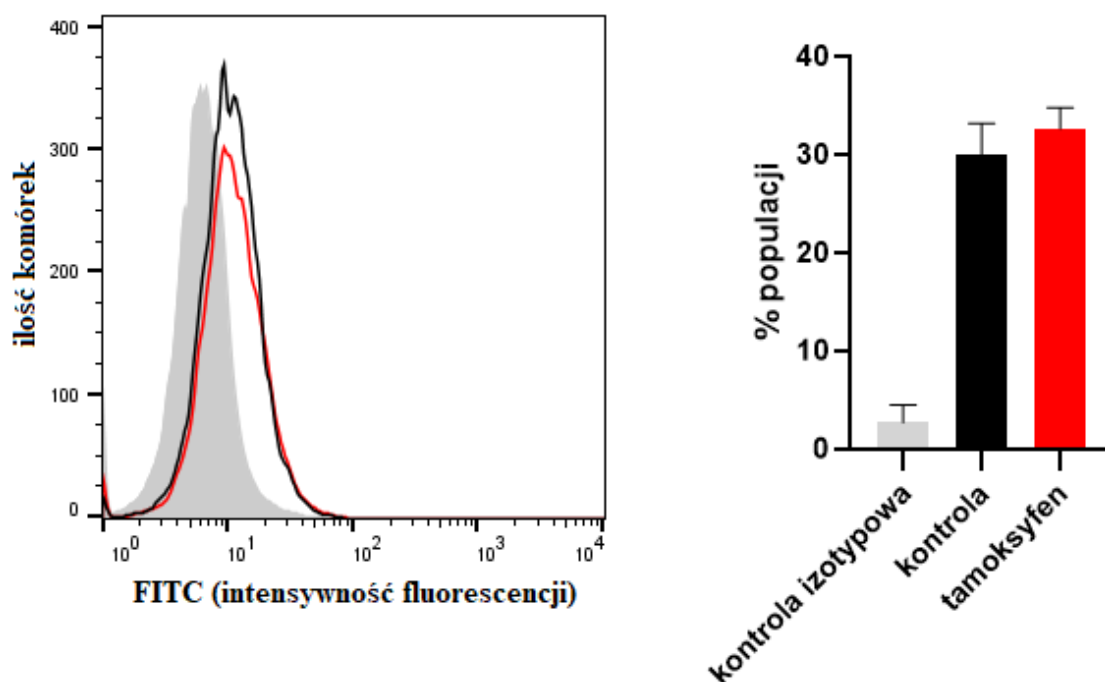


Rycina 31. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję arginazy-1 w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka piersi MDA-MB-231. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna),

tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii THP-1.

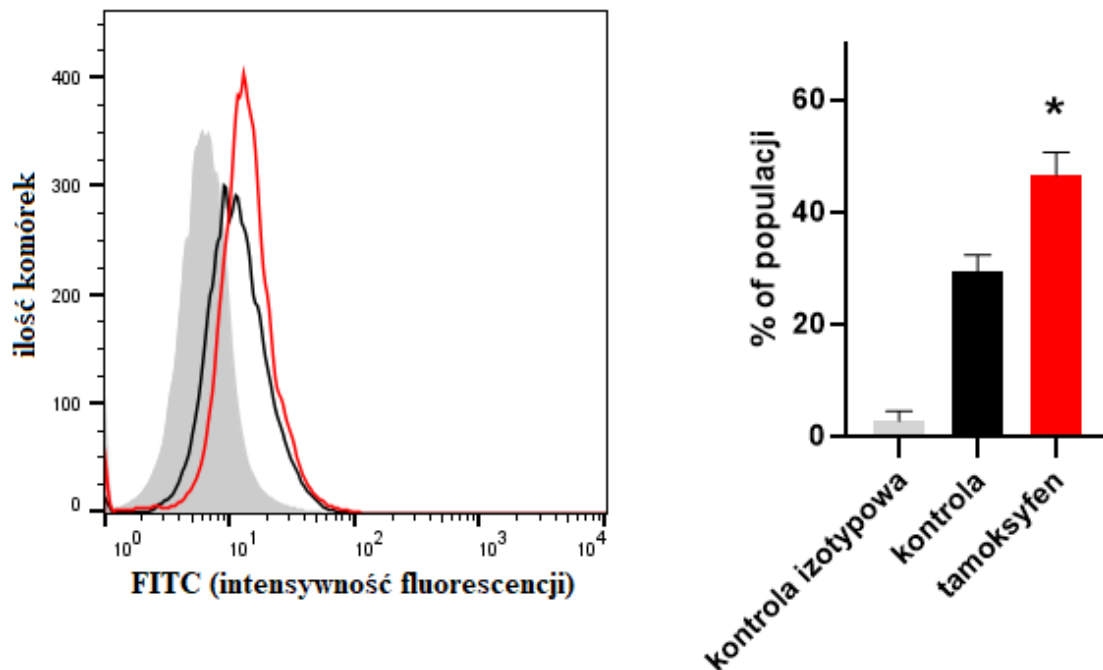
4.6. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję sparowanych receptorów Siglec-5/14 w monokulturach monocytów linii THP-1 i kokulturach z komórkami raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231.

Do oceny wpływu tamoksyfenu na ekspresję sparowanych receptorów Siglec-5 i Siglec-14 metodą cytometrii przepływowej zastosowano przeciwciała monoklonalne wiążące domenę zewnątrzkomórkową receptora Siglec-5 i Siglec-14. Na Rycinach 32, 33 i 34 przedstawiono zmiany ekspresji badanych receptorów na błonach komórkowych w monocytach THP-1 w odpowiedzi na 10 μ M tamoksyfenu w poszczególnych układach komórkowych. Ekspresja białek Siglec-5 i Siglec-14 w komórkach kontrolnych THP-1 była podobna do tej obserwowanej w komórkach rosnących w obecności komórek MCF-7 i MDA-MB-231, a łączna ilość komórek w badanych populacjach wynosiła odpowiednio $29,9 \pm 3,3\%$; $29,4 \pm 2,88$ i $27,8 \pm 4,0\%$.

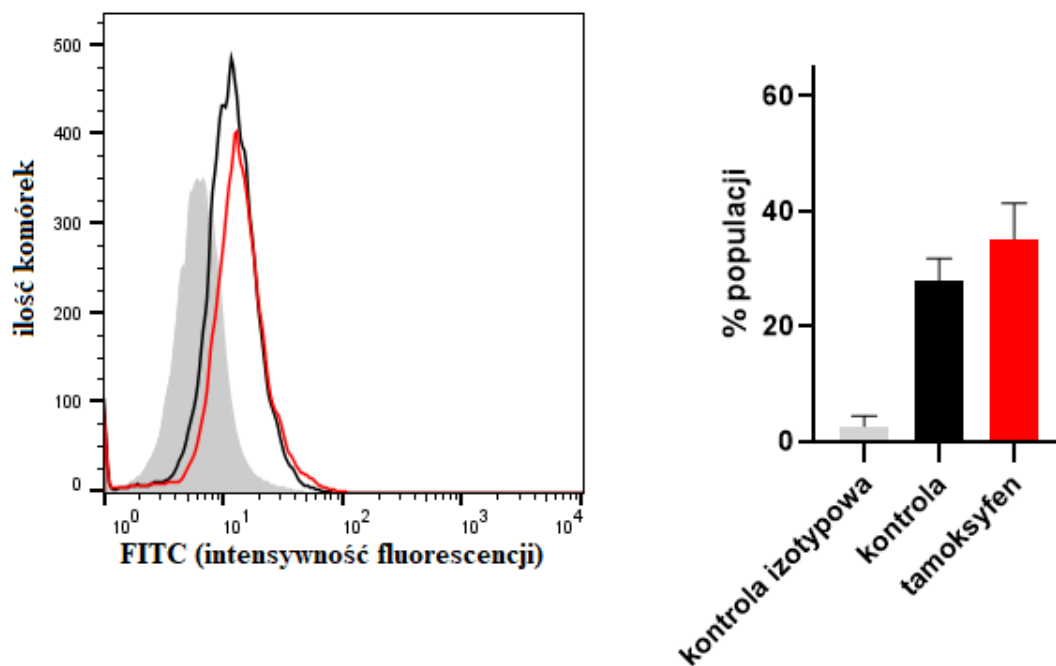


Rycina 32. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję receptorów Siglec-5/14 w monocytach linii THP-1. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii THP-1.

Stymulacja tamoksyfenem w stężeniu 10 μ M przez 24 godziny skutkowała zmianą ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 w populacjach monocytów linii THP-1 w zastosowanych układach komórkowych. W monokulturze, ilość komórek z ekspresją Siglec-5/14 wzrosła o 2,7% i stanowiła $32,6 \pm 2,17\%$ badanej populacji ($p > 0,05$; Rycina 32). Wzrost ekspresji receptorów Siglec-5/14 zaobserwowano również w populacji monocytów THP-1 w warunkach kokultury z komórkami MCF-7 i MDA-MB-231. Po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen ilość komórek z ekspresją receptorów Siglec-5/14 w kokulturze z komórkami linii MCF-7 była znacząco wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej i stanowiła $46,5 \pm 4,13\%$ badanej populacji komórek (Rycina 33). Analiza ekspresji receptorów sparowanych Siglec-5/14 po 24 godzinach ekspozycji monocytów linii THP-1 utrzymywanych w kokulturze z komórkami raka sutka MDA-MB-231 wykazała nieistotny statystycznie wzrost ekspresji receptora o 7,2% w stosunku do grupy kontrolnej (Rycina 34).



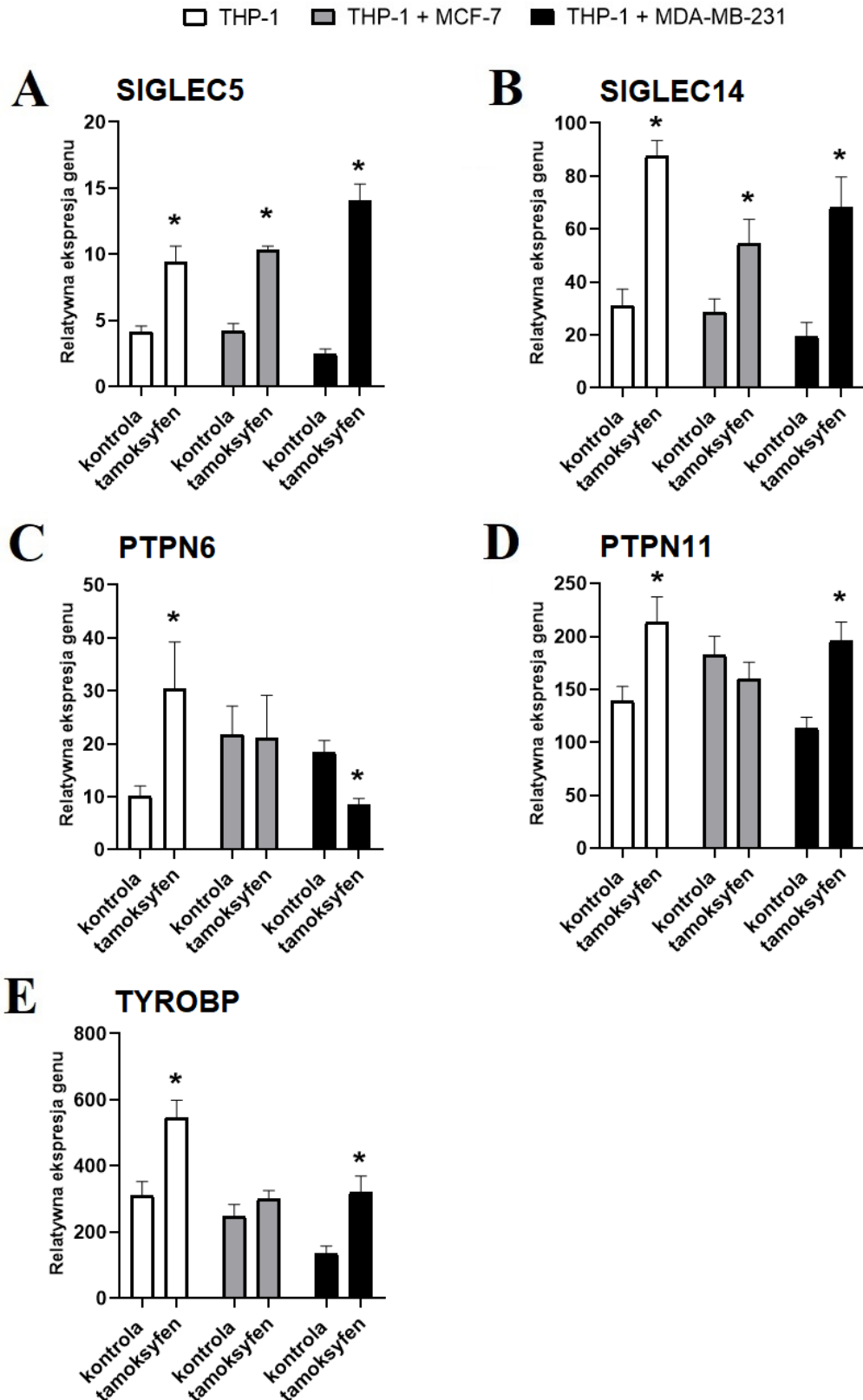
Rycina 33. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję receptorów Siglec-5/14 w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka piersi MCF-7. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do nietraktowanych komórek linii THP-1.



Rycina 34. Wpływ tamoksyfenu na ekspresję receptorów Siglec-5/14 w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka piersi MDA-MB-231. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów.

4.7. Ocena ekspresji genów *SIGLEC5*, *SIGLEC14*, *PTPN6*, *PTPN11* i *TYROBP* monokulturach monocytów linii THP-1 i kokulturach z komórkami raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231.

Biorąc pod uwagę potencjał immunomodulacyjny selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych i udział receptorów Siglec w procesach nowotworowych, ocenie ilościowej metodą Real Time PCR poddano wpływ tamoksyfenu na mechanizmy regulacji odpowiedzi immunologicznej zależnej od receptorów Siglec na poziomie genów. Zmiany poziomu transkryptów badanych genów przedstawiono na Rycinie 35 (A-E). Analiza poziomu transkryptów genów wykazała porównywalną ekspresję genów *SIGLEC5* i *SIGLEC14* w komórkach THP-1 hodowanych w warunkach monokultury i kokulturach z komórkami raka sutka linii MCF-7 i MDA-MB-231. Średni poziom transkryptu genu *SIGLEC5* w komórkach THP-1 pochodzących z monokultury oraz kokultur z komórkami MCF-7 i MDA-MB-231 wynosił odpowiednio: $4,16 \pm 0,44$; $4,19 \pm 0,58$ i $2,52 \pm 0,34$, a po 24 godzinnej ekspozycji na $10 \mu\text{M}$ tamoksyfenu zanotowano wzrost odpowiednio do wartości: $9,42 \pm 1,2$; $10,38 \pm 0,25$ i $14,08 \pm 1,25$. Powyższe zmiany były istotne statystycznie ($p < 0,05$); Rycina 35A.



Rycina 35. Poziom transkryptów genów SIGLEC5, SIGLEC14, PTPN6, PTPN11 i TYROBP w monokulturach i kokulturach monocytów linii THP-1. Wynik eksperymentu przedstawia relatywną ekspresję genu i jest średnią \pm SD z trzech próbek; * $p < 0,05$ – różnica istotna

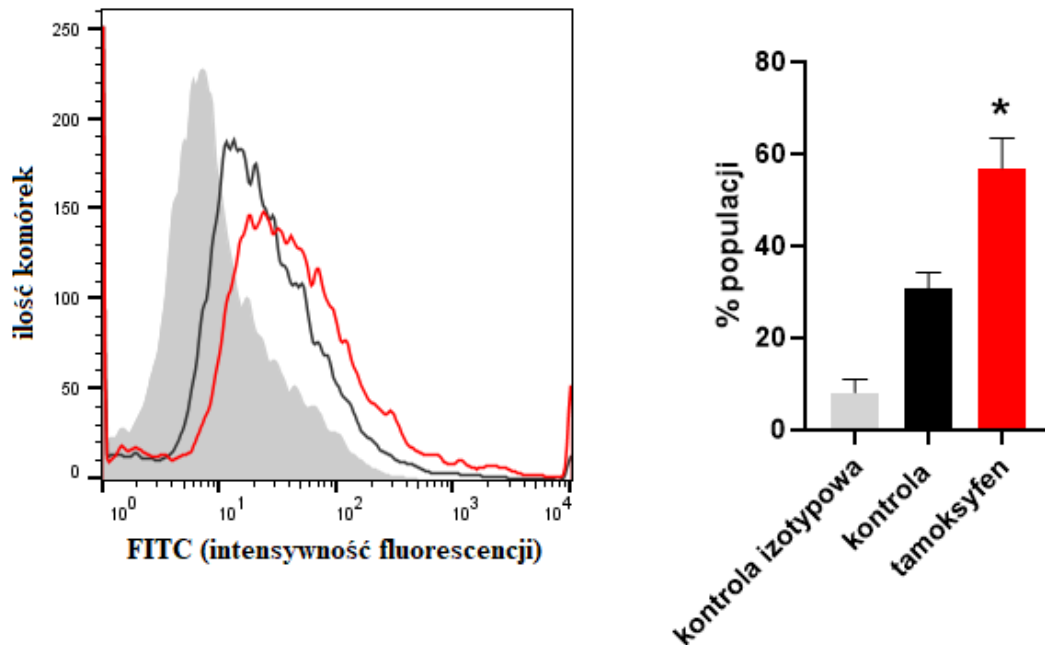
statystycznie w stosunku do nietraktowanych monocytów kontrolnych w odpowiednim układzie komórkowym.

Mimo że zmiany ekspresji genu SIGLEC14 utrzymywały tendencję wzrostową, poziom transkryptów tego genu był znacznie wyższy niż genu SIGLEC5. Średni poziom transkryptu genu SIGLEC14 w komórkach THP-1 pochodzących z monokultury oraz kokultur z komórkami MCF-7 i MDA-MB-231 wynosił odpowiednio: $31,14 \pm 6,17$; $28,76 \pm 4,89$ i $19,37 \pm 5,41$, a po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfenu w stężeniu $10 \mu\text{M}$ zanotowano wzrost odpowiednio do wartości: $87,47 \pm 5,92$; $54,41 \pm 9,2$ i $68,38 \pm 11,3$. Powyższe zmiany były istotne statystycznie ($p < 0,05$; Rycina 35B). Średni poziom transkryptów genów PTPN6 i PTPN11 w komórkach THP-1 pochodzących z monokultury wynosił odpowiednio: $10,13 \pm 1,89$ i $139 \pm 13,58$, a po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfenu w stężeniu $10 \mu\text{M}$ zanotowano istotny statystycznie wzrost odpowiednio do wartości: $30,4 \pm 8,44$; $213,16 \pm 24,2$ (Ryciny 35C, D). Ekspresja transkryptów PTPN6 i PTPN11 w monocytach THP-1 rosnących w obecności komórek MCF-7 pozostawała niezmienną po ekspozycji na tamoksyfen. Po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen, poziom transkryptu genu PTPN11 w monocytach linii THP-1 pochodzących z kokultur z komórkami MDA-MB-231 był znamienne wyższy w porównaniu z komórkami kontrolnymi ($196,15 \pm 17,4$ vs. $113,8 \pm 9,9$), podczas gdy poziom transkryptu PTPN6 był znamienne niższy w porównaniu z grupą kontrolną ($18,39 \pm 2,21$ vs. $8,57 \pm 1,13$). Analiza poziomu transkryptu genu TYROBP wykazała istotny statystycznie wzrost w monokulturze komórek linii THP-1 i w kokulturze tych komórek z komórkami raka sutka linii MDA-MB-231 po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen. Zmiany poziomu transkryptu genu w monocytach THP-1 w kokulturze z komórkami MCF-7 nie były istotne statystycznie (Rycina 35E).

4.8. Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białek fuzyjnych Siglec-5/Fc i Siglec-14/Fc z komórkami raka sutka linii MCF-7 i MDA-MB-231.

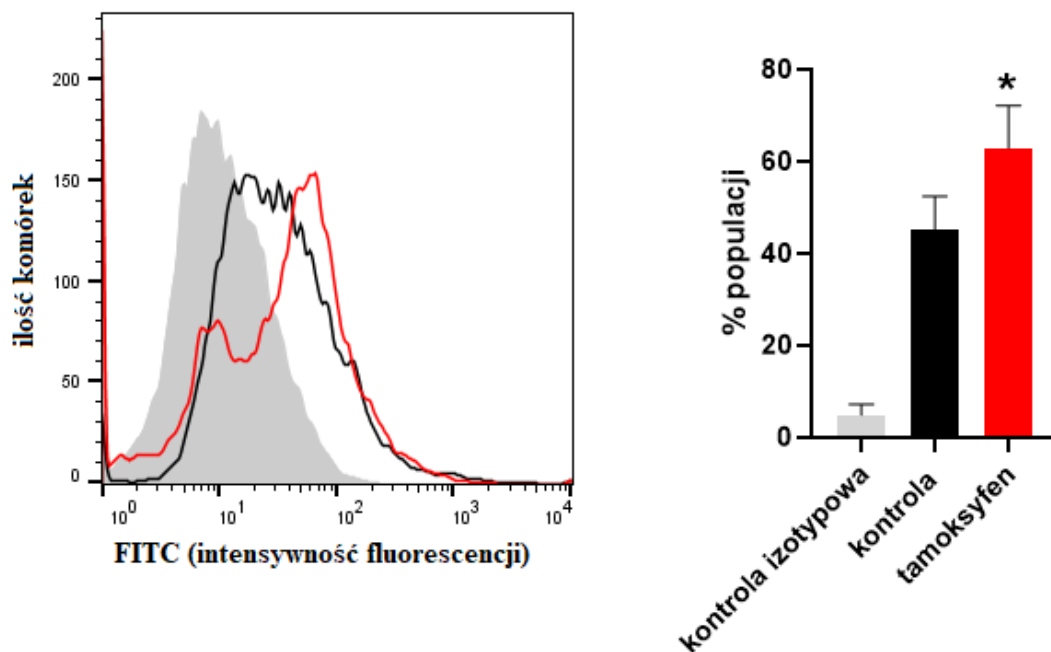
Zgodnie z ogólną hipotezą sjałoglikany powierzchniowe komórek nowotworowych pełnią kluczową rolę w procesie rozpoznawania biologicznego i nadzorze immunologicznym. W badaniu oceniono wpływ tamoksyfenu na wiązanie rozpuszczalnych rekombinowanych białek fuzyjnych receptora Siglec-5 i Siglec-14 z liniami komórkowymi raka piersi. Wyniki analizy cytometrycznej komórek MCF-7 i MDA-MB-231 wykazały, że testowane białka fuzyjne ulegają interakcji z powierzchnią błony komórek nowotworowych w przyjętych w badaniu układach komórkowych. Analiza cytometryczna wykazała, że ekspozycja komórek MCF-7 na tamoksyfen zwiększała powinowactwo białka fuzyjnego Siglec-5/Fc o około 29%

w monokulturze i 18% w kokulturze z monocytami THP-1, co stanowiło odpowiednio $56,9 \pm 6,55\%$ i $62,9 \pm 9,25\%$ analizowanej populacji. Powyższe zmiany były istotne statystycznie ($p < 0,05$); Ryciny 36 i 37.

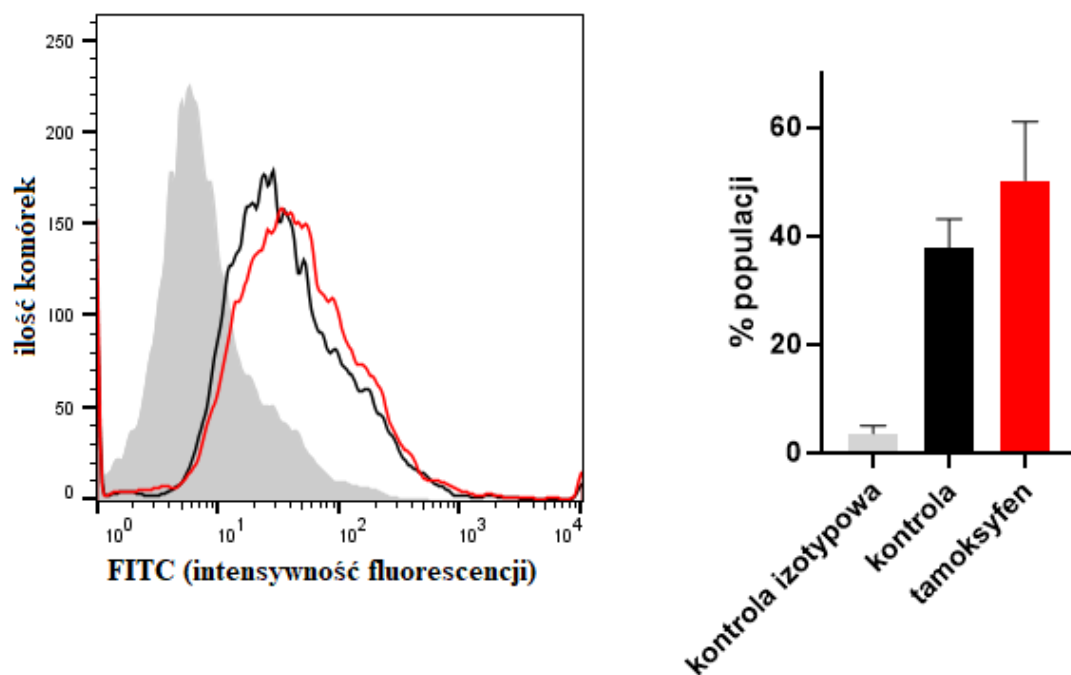


Rycina 36. Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-5/Fc z komórkami raka sutka MCF-7. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej.

W populacji komórek MDA-MB-231 poddanej 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen, interakcja z białkiem fuzyjnym Siglec-5/Fc wzrosła o 12% w monokulturze ($p > 0,05$) i 32% w kokulturze komórek nowotworowych z monocytami THP-1 ($p < 0,05$), co stanowiło odpowiednio $50,2 \pm 10,8\%$ i $57,9 \pm 11,4\%$ analizowanej populacji (Ryciny 38 i 39).

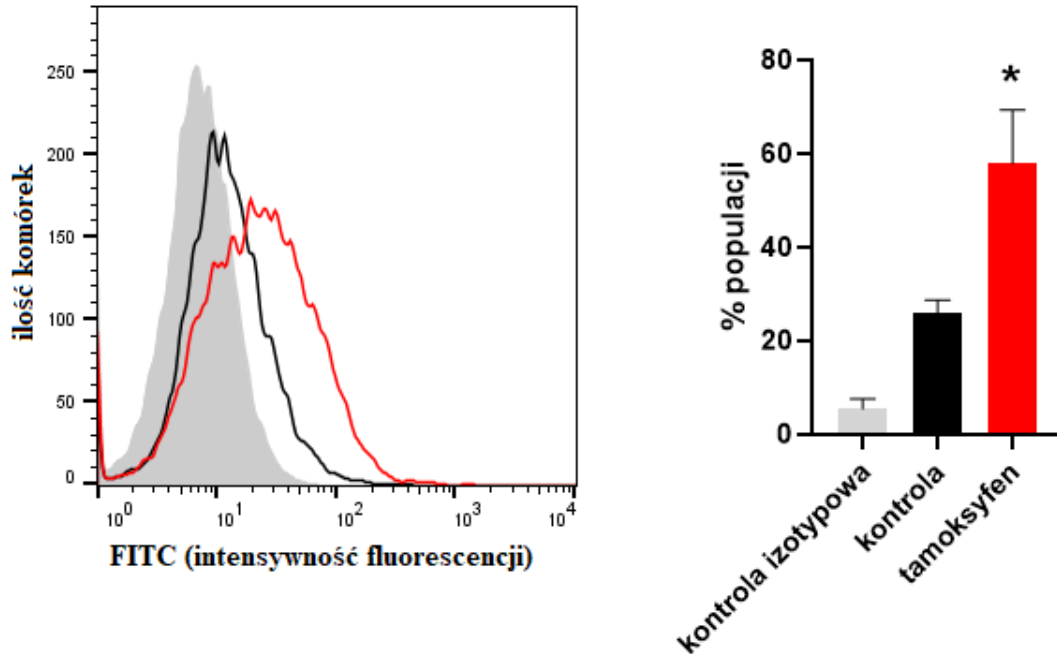


Rycina 37. Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-5/Fc z komórkami raka sutka MCF-7 w hodowli z monocytami linii THP-1. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej.



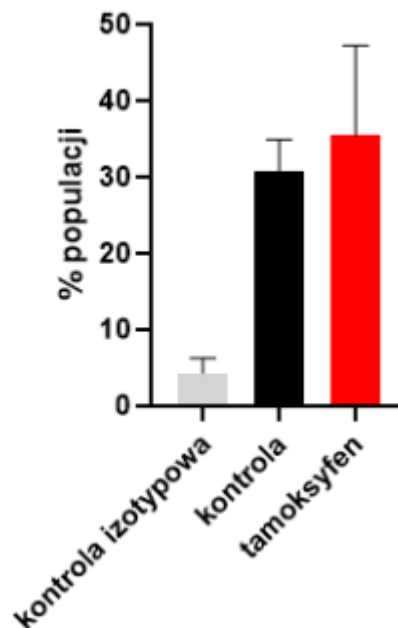
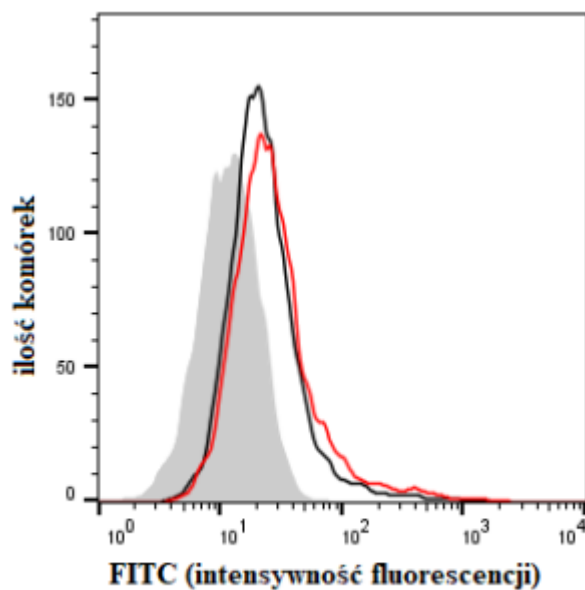
Rycina 38. Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-5/Fc z komórkami raka sutka MDA-MB-231. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen

(linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej.

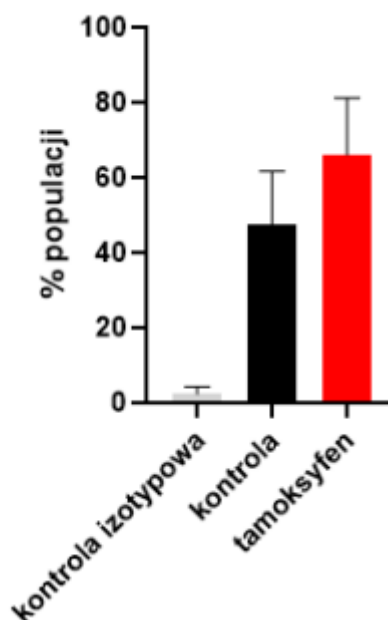
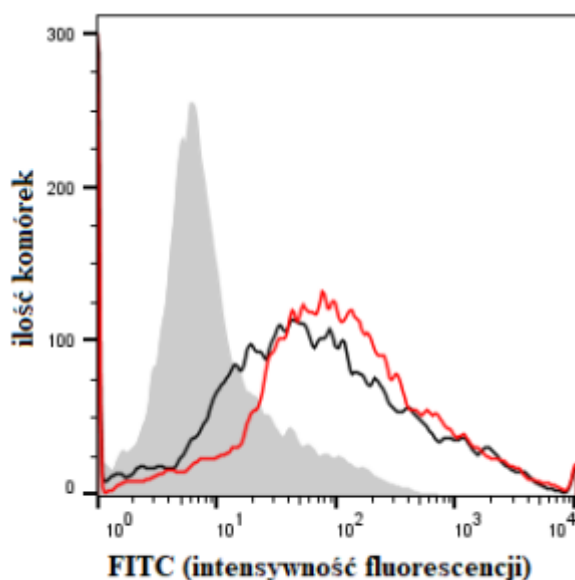


Rycina 39. Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-5/Fc z komórkami raka sutka MDA-MB-231 w hodowli z monocytami linii THP-1. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej.

Poziom wiązania białka fuzyjnego Siglec-14/Fc w populacji komórek raka sutka linii MCF-7 wskazywał tendencję wzrostową w odpowiedzi na 24 godziną stymulację tamoksyfenem w warunkach monokultury jak również w obecności monocytów linii THP-1 (Ryciny 40 i 41). W monokulturze i kokulturze, komórki MCF-7 wiążące na powierzchni błony komórkowej białko fuzyjne Siglec-14/Fc stanowiły odpowiednio $30,7 \pm 4,2\%$ i $47,4 \pm 14,2\%$ badanej populacji. W odpowiedzi na tamoksyfen ilość badanych komórek w powyższych grupach była odpowiednio wyższa o 4,7% i 18,6%. Dla powyższych zmian nie zanotowano znamienności statystycznej.

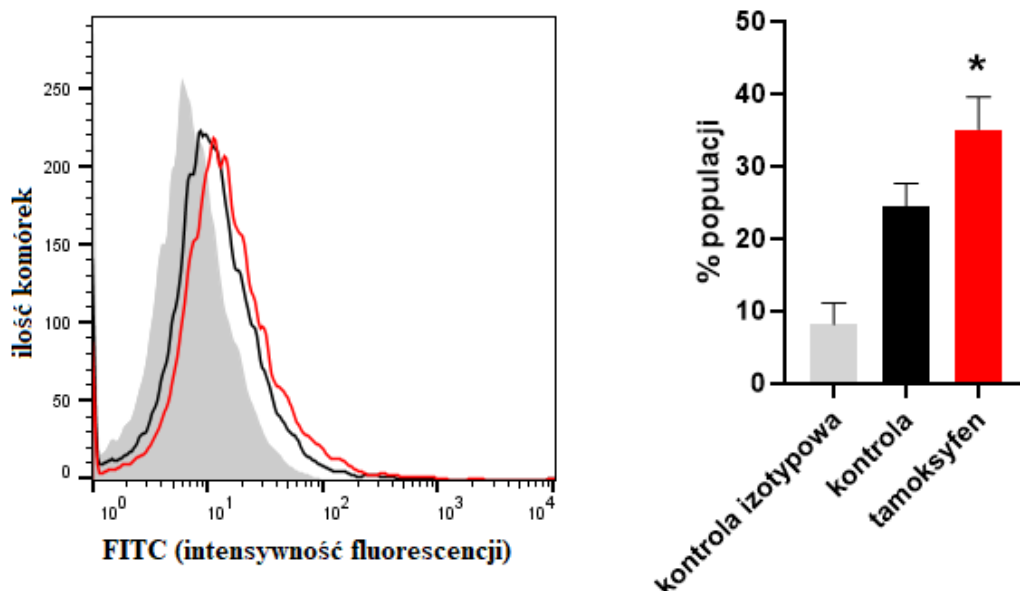


Rycina 40. Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-14/Fc z komórkami raka sutka MCF-7. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów.

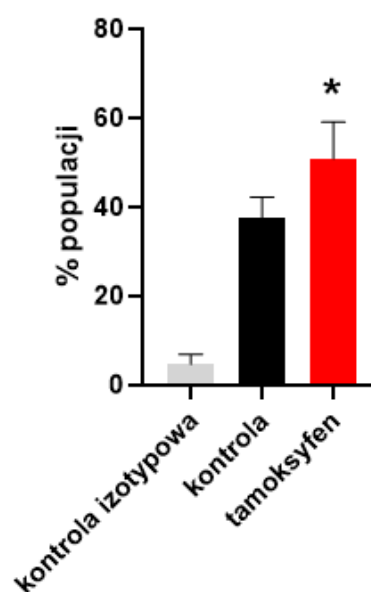
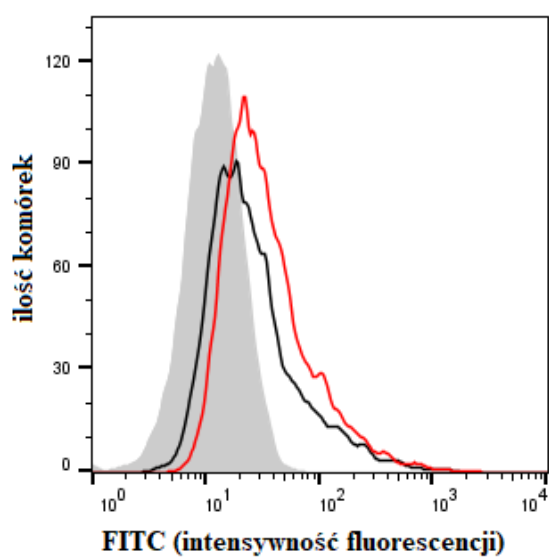


Rycina 41. Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-14/Fc z komórkami raka sutka MCF-7 w hodowli z monocytami linii THP-1. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów.

Wyniki analizy cytometrycznej komórek MDA-MB-231 sugerują, że białko fuzyjne Siglec-14/Fc wiąże się z powierzchnią błony komórek nowotworowych w zastosowanych układach komórkowych (Ryciny 42 i 43). Analiza cytometryczna wykazała, że ekspozycja komórek MDA-MB-231 na tamoksyfen zwiększa powinowactwo białka fuzyjnego Siglec-14/Fc o około 11% w monokulturze i 13% w kokulturze z monocytami THP-1, a komórki MDA-MB-231 wiążące na powierzchni błony komórkowej białko fuzyjne Siglec-14/Fc stanowiły odpowiednio $35,1 \pm 4,45\%$ i $50,8,4 \pm 8,3\%$ badanej populacji. Dla powyższych zmian zanotowano znamienność statystyczną.



Rycina 42. Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-14/Fc z komórkami raka sutka MDA-MB-231. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej.



Rycina 43. Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-14/Fc z komórkami raka sutka MDA-MB-231 w hodowli z monocytami linii THP-1. Histogramy uzyskano z analizy cytometrycznej 10000 komórek i przedstawiają kontrolę izotypową (histogram szary), grupę kontrolną (linia czarna), tamoksyfen (linia czerwona). Wykresy słupkowe przedstawiają odsetek populacji \pm SD i są średnią z 5 niezależnych eksperymentów; * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej.

V. DYSKUSJA

Rak piersi stanowi grupę nowotworów charakteryzującą się dużym zróżnicowaniem i heterogennością na płaszczyźnie molekularnej i morfologicznej [182]. Badania genomu i proteomu komórek nowotworowych piersi zdefiniowały grupy genów i białek, których zmiana ekspresji i struktury wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia procesu nowotworowego i jest czynnikiem diagnostycznym i prognostycznym w anatomicznym systemie oceny stopnia zaawansowania i strategii terapeutycznej [183,184,185]. Badania ostatnich lat wykazały, że mechanizmy progresji nowotworowej wykraczają poza zmiany wewnątrzkomórkowe i są związane z mikrośrodowiskiem guza, a interakcja komórek nowotworowych z ich otoczeniem pełni ważną funkcję w biologii nowotworu [186]. Wyniki wieloletnich badań w ramach międzynarodowych projektów biomedycznych, m.in. The Cancer Genome Atlas (TCGA), sugerują, że profilowanie i katalogowanie mikrośrodowiska nowotworu piersi na poziomie pojedynczych komórek zrębu i komórek odpornościowych jest kluczowe dla poznania mechanizmów leżących u podstaw nadzoru immunologicznego, przerzutowania, oporności na chemioterapię i niskiej wrażliwości na immunoterapię [187]. Według bazy danych TCGA krajobraz immunologiczny raka piersi jest wysoce heterogeny, a nacieki komórek odpornościowych o fenotypie supresyjnym zostały opisane jako wskaźnik aktywności inwazyjnej i są czynnikiem prognostycznym dla skuteczności terapeutycznej i całkowitego przeżycia [188].

Pomimo coraz szerszej wiedzy na temat molekularnych mechanizmów nadzoru immunologicznego i postępu w opracowaniu nowych kierunków leczenia celowanego, konwencjonalna chemioterapia nadal stanowi główną strategię w leczeniu chorób nowotworowych [189,190]. Oprócz dobrze określonych i pożądaných efektów klinicznych, standardowe terapie obejmują również liczne dodatkowe działania, począwszy od oczekiwanych i/lub nieoczekiwanych działań niepożądanych, a skończywszy na nie w pełni poznanych nowych kierunkach i mechanizmach działania leczniczego.

W niniejszej rozprawie doktorskiej dokonano oceny immunomodulacyjnego działania tamoksyfenu w komórkowym modelu raka piersi. Głównym celem badawczym było sprawdzenie, czy modyfikacjom statusu immunologicznego monocytów w badanych układach komórkowych towarzyszą zmiany ekspresji i funkcji sparowanych receptorów Siglec-5/14. Badanie wykonano na hodowlach ludzkich monocytów linii THP-1 i komórek nowotworowych piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231. Kryterium wyboru komórek nowotworowych były ich cechy biologiczne, w tym ekspresja receptorów estrogenowych i wrażliwość na tamoksyfen. Pierwszym etapem badań była ocena cytotoksycznego działania tamoksyfenu na komórki

nowotworowe i monocyty w oparciu o biochemiczny test aktywności metabolicznej MTT. Wykazano, że tamoksyfen w stężeniu 10 i 50 μM znamienne zmniejszał przeżywalność komórek MCF-7 po 24 godzinach ekspozycji o odpowiednio 22% i 58% (Rycina 17). Wynik tej obserwacji jest zbieżny z danymi literaturowymi. Darakhshan i wsp. wykazali, że tamoksyfen w stężeniach (1-20 μM) hamował żywotność komórek linii MCF-7 w sposób zależny od stężenia, a przeżywalność tych komórek po ekspozycji na stężenie 10 μM spada o około 30% po 24 godzinach ekspozycji [191]. W podobnym badaniu, Rohlenova i wsp. określili wartość IC_{50} dla tamoksyfenu w hodowli komórek linii MCF-7 na poziomie 15,6 μM [192]. W populacji komórek MDA-MB-231 nie zanotowano znacznego spadku przeżywalności, a populacja monocytów linii THP-1 zmniejszyła się znamienne po narażeniu na najwyższe testowane stężenie leku (Ryciny 18 i 19). Do dalszych badań nad immunomodulującymi właściwościami tamoksyfenu wybrano stężenie 10 μM . Decyzję podjęto w oparciu o dane literaturowe na temat stężeń tamoksyfenu w surowicy krwi i narządach oznaczanych w praktyce klinicznej. Badania White-Gilbertsona i wsp. wykazały, że stężenie tamoksyfenu w surowicy wynosi 96-200 ng/ml (0,25-0,5 μM) po zażyciu powszechnie stosowanych dawek klinicznych w zakresie 20-40 mg/dobę [193]. Autorzy badania sugerują również, że stężenie tamoksyfenu w narządach jest około 10 razy wyższe z powodu kumulacji leku w tkankach. Z badania wynika, że stężenie tamoksyfenu w tkankach prawidłowych i nowotworowych wynosi około 5 μM . Wyższe stężenia tamoksyfenu w tkankach sugerują badania Lien i wsp. [194]. Autorzy sugerują, że stężenie leku i jego metabolitów w ludzkich narządach jest około 8-60 razy większe niż w surowicy, a najwyższy poziom zanotowano w płucach i wątrobie. Analiza stężeń tamoksyfenu w tkankach nowotworowych wykazała wysokie wartości w guzach pierwotnych piersi i trzustki oraz nowotworach przerzutowych do mózgu [194].

Uzupełnieniem testu cytotoksyczności było badanie potencjału migracyjnego komórek nowotworowych po 24 godzinnej ekspozycji na 10 μM tamoksyfenu. Wykazano, że 24 godzinna ekspozycja na tamoksyfen zmniejsza aktywność migracyjną komórek MCF-7 i MDA-MB-231, jednak efekt ten był znacznie silniejszy w przypadku estrogenozależnych komórek MCF-7 (Ryciny 20-23). Na uwagę zasługuje również obserwacja, że potencjał migracyjny testowanych linii nowotworowych był wyższy w obecności monocytów linii THP-1.

U podstaw obserwowanych efektów wpływu tamoksyfenu na badane komórki nowotworowe piersi w przyjętym modelu doświadczalnym leży podstawowy mechanizm działania leku, w wyniku którego blokowanie receptorów estrogenowych redukuje ekspresję genów

regulowanych przez estrogeny, w tym czynniki wzrostu, a także zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G0 i G1, co zmienia równowagę między proliferacją komórek a ich trwającą utratą [195]. Powyższe efekty mają duże znaczenie w praktyce klinicznej. Pomimo dynamicznego rozwoju nowoczesnych kierunków terapii, SERM, w tym tamoksyfen, są nadal jedną z głównych metod uzupełniającego leczenia nowotworów piersi wykazujących obecność receptora estrogenowego zarówno u chorych przed menopauzą, jak i w okresie postmenopauzalnym, a także w neoadjuwantowym leczeniu raka piersi [196].

Oprócz efektów terapeutycznych ściśle związanych z mechanizmem działania leku, tamoksyfen wykazuje również działanie immunomodulujące [196]. Ma to szczególne znaczenie w wykorzystaniu leków z grupy SERM w postępowaniu terapeutycznym w przypadku nowotworów piersi bez ekspresji receptora estrogenowego. Badania ostatnich lat wykazały, że terapia antyestrogenowa z wykorzystaniem tamoksyfenu odwraca supresyjne działanie estrogenów na procesy formowania odporności, co skutkuje obniżonym poziomem regulatorowych komórek T (Treg) i makrofagów fenotypu M2 oraz zwiększonym poziomem efektorowych komórek T CD4+ i CD8+ [193]. Kliniczne znaczenie tamoksyfenu w odporności przeciwnowotworowej zostało potwierdzone zarówno w przypadku nowotworów estrogenozależnych ER(+), jak i estrogenoniezależnych ER(-), jednak molekularne mechanizmy tego działania nie są w pełni poznane [197].

Monocyty i różnicujące się z nich makrofagi stanowią dużą część populacji leukocytów naciekających tkanki nowotworowe [198]. Rola tych komórek w procesie nowotworowym jest złożona i zależy od zdolności zmiany fenotypu, który przystosowuje je do otaczającego środowiska. Na podstawie wyników badań na populacji makrofagów wyróżniono dwa podstawowe fenotypy tych komórek. Immunofenotyp M1 opisuje prozapalne cechy makrofagów i związany jest z wydzielaniem IL-6, IL-12, TNF- α i INF- γ , nasileniem aktywności fagocytarnej i zwiększonej ekspresji białek powierzchniowych, np. CD11b, CD68, CD80, CD86, CD204 i HLA-DR. Produkcja cytokin prozapalnych przez makrofagi M1 warunkuje ich spontaniczną cytotoksyczność, dlatego komórkom o fenotypie M1 przypisano udział w promowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej [199,200]. Plastyczność fenotypu makrofagów jest czynnikiem promującym proces nowotworowy. Obecność komórek nowotworowych i bodźce z mikrośrodowiska nowotworu, promują polaryzację makrofagów w kierunku fenotypu M2. Badania wykazały, że komórki z fenotypem M2 stanowią populację dominującą wśród makrofagów naciekających tkanki nowotworowe i powstają w odpowiedzi na stymulację IL-4, IL-10 i IL-13 oraz glikokortykosteroidami. Cechą wspólną tych komórek jest wydzielanie IL-10 oraz arginazy-1, które hamują produkcję cytokin prozapalnych przez

komórki układu immunologicznego, dlatego też fenotyp M2 określany jest jako pronowotworowy [201, 202].

W drugim etapie badań określono wpływ tamoksyfenu na aktywność monocytów linii THP-1 w testowanych układach komórkowych. W badaniu z wykorzystaniem cytometrii przepływowej skupiono się na ekspresji białka CD68 i arginazy-1 jako wskaźników fenotypu M1 i M2.

Białko CD68 jest glikoproteiną błonową, której ekspresję opisano głównie w wewnątrzkomórkowych lizosomach monocytów i makrofagów jak również w komórkach dendrytycznych i granulocytach krwi obwodowej [203]. Dystrybucja CD68 w tych komórkach łączy się głównie z regulacją aktywności fagocytarnej, zarówno na poziomie wewnątrzkomórkowego metabolizmu w lizosomach, jak również w interakcjach komórka-komórka i komórka-patogen [203]. Mimo że białko CD68 jest uznanym markerem fenotypu M1, jego rola w procesie nowotworowym nie jest w pełni poznana. Dane kliniczne sugerują, że wysoka ekspresja CD68 w naciekowych makrofagach w przebiegu wybranych nowotworów koreluje z niekorzystnym rokowaniem, mimo że fenotyp M1 tych komórek uznawany jest jako przeciwnowotworowy [204]. Badania Mahmouda i wsp. wykazały, że nowotwory piersi o wysokim stopniu infiltracji makrofagami M1 z ekspresją CD68 cechowały się wyższym stopniem agresywności i wysokim potencjałem proliferacyjnym [205]. W niniejszej pracy wykazano, że 24 godzinna ekspozycja monocytów linii THP-1 na tamoksyfen w warunkach monokultury zwiększa znamienne ekspresję CD68 w tych komórkach (Rycina 26). Na podstawie tych wyników można wnioskować, że tamoksyfen zwiększając ekspresję CD68 promuje fenotyp M1 i prozapalne właściwości komórek. Ponadto, podobne wyniki uzyskano podczas inkubacji monocytów THP-1 z PMA jako induktorem procesu różnicowania monocytów w makrofagi (Rycina 25). Na szczególną uwagę zasługuje jednak poziom ekspresji CD68 w monocytach THP-1 hodowanych w warunkach kokultury z komórkami nowotworowymi MCF-7 lub MDA-MB-231. Poziom CD68 w badanych próbach po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen był znacznie wyższy niż w monokulturze THP-1 (Ryciny 27 i 28). Powyższe wyniki mogą sugerować, że wyższa ekspresja CD68 w kokulturze wynika z rosnącej wrażliwości monocytów na tamoksyfen. Aby potwierdzić rolę tamoksyfenu w regulacji immunofenotypu monocytów linii THP-1 oceniono ekspresję arginazy-1. Według danych literaturowych, izoenzymy arginazy pełnią kluczową funkcję w regulacji immunofenotypu komórek odpornościowych [206]. Badania wykazały, że arginaza-1 ulega dominującej ekspresji w komórkach M2 i ogranicza biodostępność wewnątrzkomórkowej L-argininy [207,208]. Skutkiem tego procesu jest zmniejszenie syntezy tlenku azotu (NO) oraz

tłumienie reakcji prozapalnych [209]. Doniesienia o roli arginazy-2 w regulacji fenotypu makrofagów są sprzeczne, ale równoległa komórkowa ekspresja indukowanej syntetazy tlenu azotu (iNOS) i arginazy-2 w przebiegu procesu zapalnego sugeruje, że enzym jest związany z odpowiedzią prozapalną [210]. W niniejszej pracy potwierdzono wysoki poziom ekspresji arginazy-1 w monocytach linii THP-1 utrzymywanych w hodowli w warunkach monokultury (Rycina 29). Może to sugerować, że niestymulowane komórki kontrolne wykazują cechy fenotypu przeciwzapalnego M2. Podobne obserwacje zanotowano, gdy monocyty linii THP-1 hodowano w obecności komórek MDA-MB-231 (Rycina 31). Niestymulowane komórki kontrolne hodowane w warunkach kokultury z komórkami MCF-7 prezentowały niższy poziom badanego enzymu, co może wskazywać na oddziaływanie badanych komórek w hodowli i promocję prozapalnego fenotypu M1 (Rycina 30). Ekspozycja monocytów THP-1 na tamoksyfen we wszystkich układach komórkowych powodowała spadek ekspresji arginazy-1, ale znamienność statystyczną zanotowano w monokulturze i kokulturze z komórkami MCF-7. Powyższe wyniki mogą sugerować, że wyższa wrażliwość komórek MCF-7 na tamoksyfen promuje degradację populacji tych komórek, a monocyty i makrofagi z przewagą fenotypu M1 mogą usuwać komórki o cechach apoptozy. Uzupełnieniem powyższych badań jest analiza stężenia cytokin w nadsączach komórkowych izolowanych z poszczególnych układów komórkowych. Wyniki badania przedstawione na Rycinie 24 sugerują prozapalny wpływ tamoksyfenu w hodowli komórkowej. Wskazują na to zmiany stężenia cytokin prozapalnych, których poziom, oprócz IL-6, wykazywał tendencję wzrostową. Wyniki uzyskane w przypadku IL-10 i IL-12p70 są trudne w interpretacji, ponieważ ich stężenia nie mieściły się w zakresie czułości metody. Na szczególną uwagę zasługuje znamienny wzrost stężenia TNF α we wszystkich analizowanych układach komórkowych. Ta obserwacja potwierdza badania innych autorów. Teodorczyk-Injeyan i wsp. wykazali, że tamoksyfen stymuluje produkcję TNF α w hodowlach ludzkich jednojądrzastych krwinek obwodowych [211]. Biorąc pod uwagę rolę TNF α w odpowiedzi zapalnej, wzrost stężenia tej cytokiny w nadsączu komórkowym może sugerować stymulowanie fagocytozy i działanie cytotoksyczne względem komórek nowotworowych. Badania wykazały, że tamoksyfen promuje również dojrzewanie i sekrecję IL-1 β przez makrofagi [212, 213]. Ponadto, Evavold i wsp. wykazali, że sekrecja IL-1 β przez makrofagi w wyniku ekspozycji na tamoksyfen nie jest związana z lizą tych komórek [214]. W niniejszej pracy również zanotowano wysokie stężenia IL-1 β po ekspozycji na tamoksyfen, ale efekt ten był obserwowany w kokulturach komórek nowotworowych z monocytami linii THP-1. Poziom stężenia IL-1 β w monokulturach był poniżej czułości zastosowanej metody. Wysoki poziom IL-1 β w kokulturach może wynikać z komunikacji między poszczególnymi typami

komórek oraz zwiększonej produkcji i sekrecji tej cytokiny przez komórki THP-1 jak również komórki nowotworowe po ekspozycji na tamoksyfen. Habanjar i wsp. zauważają jednak, że niektóre cytokiny, m.in. IL-1 β , IL-6 i IL-8, w rakach piersi mogą stymulować proliferację i inwazję komórek nowotworowych oraz modulować obronę przeciwnowotworową organizmu [215]. Analizując uzyskane wyniki należy również zauważyć, że źródło cytokin w kokulturach raka piersi i komórek odpornościowych nie jest dobrze określone, co można uznać za ograniczenie prezentowanego badania. Jednak biorąc pod uwagę większą podatność komórek odpornościowych na produkcję cytokin i aktywność wydzielniczą w porównaniu z komórkami złośliwymi, można przyjąć, że monocyty THP-1 są głównymi donorami oznaczonych cytokin. Ten wniosek można poprzeć wynikami przeprowadzonego fenotypowania immunologicznego komórek THP-1 opartymi na arginazie-1. Ponadto, Liu i wsp. w analizie porównawczej proces syntezy i wydzielania cytokin przez monocyty THP-1 i komórki nowotworowe płuca H292 wykazała istotnie wyższą ekspresję TNF α w komórkach THP-1 (ok. 1100 pg/ml) niż w H292 komórek (ok. 40 pg/ml) po 24 godzinnej stymulacji lipopolisacharydem (LPS) [216].

Badania nad mechanizmami działania tamoksyfenu wskazują, że efekty terapeutyczne leku dzielą się na zależne i niezależne od receptorów estrogenowych. Mechanizmy określane jako „off-target” są przedmiotem intensywnych badań nad potencjalnym wykorzystaniem tamoksyfenu w terapii procesów chorobowych niezależnych od receptorów estrogenowych, w tym nowotworów piersi ER(-) [217]. Dane literaturowe sugerują potencjalne mechanizmy prozapalnego działania tamoksyfenu w makrofagach. Spójne dane wskazują, że obejmują one mediatory lipidowe i szlaki sygnałowe, takie jak czynnik jądrowy erytroidalny 2 związany z czynnikiem 2 (Nrf2) i kaspaza-1, które pozwalają tym makrofagom poddać się adaptacji fenotypowej, a zależna od kaspazy-1 produkcja i sekrecja cytokin nie wpływa na żywotność tych komórek [212,213,218]. Sfogliarini i wsp. sugerują jednak, że mechanizm prozapalny indukowany przez tamoksyfen w makrofagach jest inny niż ten obserwowany w hepatocytach [217]. Dane literaturowe sugerują również, że ekspozycja na tamoksyfen zwiększa wydzielanie TNF α w komórkach spoza układu immunologicznego. Ore i wsp. wykazali, że zwiększone stężenie TNF α w surowicy krwi zwierząt doświadczalnych koreluje z markerami uszkodzenia wątroby, co może obrazować jedno z wielu działań niepożądanych leku [219]. Poszczególne badania wykazały, że molekularny mechanizm działania tamoksyfenu w makrofagach jest przede wszystkim związany z aktywacją fosfokinazy C (PKC) i transkrypcją czynników, takie jak receptor glikokortykosteroidowy (GR), receptory aktywowane przez proliferatory peroksydomów γ (PPAR γ) oraz przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 1 (STAT1) [220, 221, 222]. Ponadto, Feng i Pepe wykazali również, że tamoksyfen oddziałuje również na

szlak sygnalizacyjny zależny od PI3K/AKT i związana z nim aktywacja Nrf2 prowadzi do hamowania arginazy-1 jako markera polaryzacji [212, 218]. Prozapalne działanie tamoksyfenu jest więc związane ze zmianami markerów aktywacji fenotypu M1 makrofagów, co potwierdza podwyższony poziom TNF- α i IL-1 β oraz obniżenie ekspresji arginazy-1. Proces ten ma szczególne znaczenie w nowotworze piersi, ponieważ zmiany w aktywności enzymatycznej arginaz zostały uznane jako markery progresji nowotworu piersi. Perez i wsp. wykazali, że wysoka aktywność arginazy w osoczu pacjentek z nowotworem piersi koreluje z stopniem zaawansowania choroby [222].

Biorąc pod uwagę znaczenie odporności gospodarza w progresji raka, przekształcenie immunosupresyjnego środowiska guza w efektor immunogeny może być jednym z kierunków terapii nowotworów. Liczne badania nad biologią raka piersi koncentrują się na zmianach składu komórkowego mikrośrodowiska i znaczeniu jego sygnatur molekularnych w praktyce klinicznej. Soysal i wsp. wykazali, że zarówno hamowanie rekrutacji makrofagów związanych z guzem, jak i przeprogramowywanie tych komórek z fenotypu M2 na M1 zapobiega progresji guza i poprawia skuteczność standardowej chemioterapii [223]. Istnieje coraz więcej dowodów na to, że podawanie tamoksyfenu bezpośrednio wpływa na promującą nowotwór funkcję MDSC i komórek dendrytycznych (DC) oraz zwiększa liczbę efektorowych i cytotoksycznych limfocytów T infiltrujących niszę nowotworową [224]. Zjawisko to zaobserwowano w wielu komórkach złośliwych niewrażliwych na tamoksyfen, w tym w czerniaku, raku płuc i sutka, i skorelowano z przedłużonym całkowitym przeżyciem [224, 225]. Niemniej jednak podstawowe mechanizmy leżące u podstaw zmian w puli komórek odpornościowych przez tamoksyfen nie są w pełni poznane. Ostatnie postępy w immunobiologii raka piersi ujawniły rekrutację białek systemu punktów kontrolnych układu immunologicznego (immune checkpoints) w mechanizmie regulacyjnym Treg naciekającym nowotwór. Jak wykazano, zwiększenie puli limfocytów T specyficznych dla PD-L1 jest niezbędna do utrzymania odpowiedzi zapalnej poprzez supresję regulatorowych komórek T [226]. Istnieją doniesienia, że niektóre chemioterapeutyki mogą zmieniać ekspresję białek systemu „immune checkpoints”, jednak niewiele wiadomo na temat znaczenia tego zjawiska w praktyce klinicznej i jego zastosowania podczas terapii systemowej raka piersi [227, 228, 229]. Kilka danych potwierdziło wywołane przez tamoksyfen zmiany ekspresji i funkcji punktów kontroli immunologicznej PD-1 i CTLA-4. Obserwacje Huhna i wsp. wykazały, że deprivacja estrogenów zwiększa ekspresję PD-L1, czemu towarzyszą zmiany w transkrypcji cytokin zapalnych w raku piersi ER+ [230].

Różnorodność dystrybucji receptorów Siglec w komórkach układu immunologicznego oraz ich powinowactwo do sjalowanych ligandów specyficznych dla tkanek wskazuje na rolę w procesie utrzymania homeostazy immunologicznej opartej na procesie rozpoznawania biologicznego i kontroli immunologicznej. Dostępne dane sugerują, że interakcja między komórkami wykazującymi ekspresję receptora Siglec a nieprawidłowo sjalowanymi komórkami nowotworowymi rekrutuje wewnątrzkomórkowe systemy przekazywania sygnałów, które tworzą mechanizm nadzoru immunologicznego w nowotworach. Udział receptorów Siglec z wewnątrzkomórkową domeną ITIM w procesie nowotworowym negatywnie moduluje odpowiedź immunologiczną poprzez promowanie mikrośrodowiska immunosupresyjnego i osłabienia nadzoru immunologicznego, które leżą u podstaw tzw. ucieczki immunologicznej guza. Zaangażowanie receptorów Siglec z domeną ITAM w proces nowotworowy może więc być istotne w zmianie supresyjnego fenotypu M2 w przeciwnowotworowy fenotyp M1 [231, 232, 233].

Biorąc pod uwagę powszechne zastosowanie leków przeciwestrogenowych w terapii nowotworów piersi, w kolejnym etapie badań analizowano udział receptorów Siglec w procesie nadzoru immunologicznego w monocytach linii THP-1 eksponowanych na tamoksyfen. W badaniu ocenie poddano ekspresję białek sparowanych receptorów Siglec-5 i Siglec-14 w testowanych układach komórkowych po ekspozycji na tamoksyfen. Dodatkowym aspektem analizy było zbadanie ekspresji transkryptów genów SIGLEC-5 i SIGLEC-14, genów niereceptorowych fosfataz tyrozynowo-białkowych typu 6 i 11 (PTPN6 i PTPN11) a także genu białka wiążącego kinazę tyrozynową (TYROBP). Mimo że wcześniejsze badania potwierdziły modulujący wpływ chemioterapeutyków na ekspresję i funkcję receptorów Siglec, w tym sparowanych receptorów Siglec-5/14 i Siglec-11/16, nie były one szeroko badane w dziedzinie immunostymulujących funkcji tamoksyfenu [227].

Ekspresja białek Siglec-5 i Siglec-14 została oceniona za pomocą cytometrii przepływowej po wyznakowaniu komórek specyficznym przeciwciałem monoklonalnym rozpoznającym domeny zewnątrzkomórkowe obu receptorów błonowych. Wzrost ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 w błonie stwierdzono w komórkach THP-1 rosnących w warunkach kokultury z komórkami nowotworowymi, ale zmiany te były znamienne statystycznie w obecności komórek MCF-7 (Ryciny 32, 33, 34). Na tym etapie badania nie można wskazać, który receptor wykazywał zmienioną ekspresję w analizowanych populacjach monocytów THP-1. Zjawisko to można tłumaczyć właściwościami przeciwciała użytego w badaniu cytometrycznym. Homologia struktury części zewnątrzkomórkowej sparowanych receptorów Siglec-5/14 powoduje, że komercyjne przeciwciała charakteryzują się wysokim

powinowactwem do Siglec-5 oraz reaktywnością krzyżową z receptorem Siglec-14. Zanotowane zmiany mogą potwierdzić ostatnie odkrycia w dziedzinie immunobiologii raka piersi, które sugerują, że zmiany ekspresji receptorów Siglec i sialoglikanów są związane z transformacją nowotworową i stanowią część mechanizmu unikania odpowiedzi immunologicznej [234 , 235 , 236]. Badania funkcji receptorów Siglec w procesie nowotworowym wskazują na dominującą rolę immunosupresyjnych receptorów Siglec i ich ligandów. Wykazano, że zwiększona ekspresja sjalowanych mucyn jest markerem aktywności wydzielniczej komórek nowotworowych a ich interakcja z Siglec-9 jest głównym regulatorem tolerancji immunologicznej u chorych na raka piersi [237]. Według Beatsona i wsp. infiltracja komórek wykazujących ekspresję Siglec-9 do guzów piersi z ekspresją mucyny-1 wywołuje efekt immunosupresyjny poprzez rekrutację cząsteczek sygnałowych SHP-1 i SHP-2 [237]. Barkal i wsp. wykazali, populacje komórkowe naciekające guzy piersi, w tym guzy potrójnie ujemne, charakteryzują się obecnością komórek Siglec-7 i Siglec-10 dodatnich w zrębie guza [238]. Było to skorelowane z wysoką zawartością sialoglikoprotein w obszarach włóknistych tkanki guza. Badanie przeprowadzone przez Shaffi i wsp. wykazało, że w zrębie guza piersi około 70% komórek wykazuje ekspresję receptora Siglec-15, co wyklucza się wzajemnie z ekspresją PD-L1 [236]. Może to sugerować znaczenie kliniczne receptora Siglec-15 w terapii celowanej u pacjentów z negatywną odpowiedzią na blokadę PD-1/PD-L1.

Uzupełnieniem cytometrycznej analizy ekspresji białek receptorowych Siglec-5 i Siglec-14 była analiza poziomu transkryptów genu SIGLEC-5 i SIGLEC-14 (Rycina 35 A, B). Badanie z wykorzystaniem RealTime-PCR potwierdziło ekspresję transkryptów dla SIGLEC5 i SIGLEC14 w monocytach THP-1. W badaniu wykazano modulujący wpływ tamoksyfenu na transkrypty analizowanych genów SIGLEC w populacjach komórek. Mimo że wpływ tamoksyfenu stwierdzono zarówno w monocytach hodowanych zarówno w warunkach monokultury i kokultury, transkrypt genu SIGLEC14 wykazywał najwyższą względną ekspresję we wszystkich analizowanych grupach. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że ekspresja receptora Siglec-14 była dominująca w badanych układach komórkowych. Wniosek ten potwierdza również polaryzacja komórek THP-1 w kierunku fenotypu M1 na co wskazuje obniżenie ekspresji arginazy-1 w komórkach poddanych ekspozycji na tamoksyfen. Ponadto, wysokiej względnej ekspresji transkryptu genu Siglec-14 towarzyszyła wysoka względna ekspresja transkryptu genu TYROBP (Rycina 35 E). Ocena ekspresji transkryptów genów PTPN6 i PTPN11 nie jest jednoznaczna (rycina 35 C,D). Badanie wykazało rozbieżności w kierunku zmian ekspresji poszczególnych genów w zależności od układu komórkowego poddanego ekspozycji na tamoksyfen. W monokulturze monocytu linii

THP-1 wykazały znamiennej wzrost ekspresji genu PTPN6 i PTPN11 w odpowiedzi na tamoksyfen. Nieznaczny spadek poziomu obu genów zanotowano w hodowli monocytów THP-1 z zależnymi od estrogenów komórkami raka piersi linii MCF-7. W kokulturze komórek THP-1 z niezależnymi od estrogenów komórkami MDA-MB-231, tamoksyfen zmniejszał poziom transkryptu genu PTPN6, podczas gdy transkrypt genu PTPN11 wykazywał tendencję wzrostową. W ocenie różnic w ekspresji poszczególnych transkryptów analizowanych genów należy uwzględnić relatywnie krótki czas narażenia komórek na tamoksyfen, co może wpływać na działanie regulujące ekspresję genów przez receptory estrogenowe w cytoplazmie.

Ekspresja sparowanych receptorów Siglec w populacji ludzkiej odzwierciedla mechanizm genetycznie uwarunkowanej odpowiedzi immunologicznej. Ma to szczególne znaczenie ze względu na zależne od genów ludzkie immunofenotypy charakteryzujące się zmienną ekspresją sparowanych receptorów Siglec. Wykazano, że pacjenci z dominującą ekspresją genu SIGLEC14 (SIGLEC-14^{+/+}) rozwijają ostrą odpowiedź immunologiczną w zaburzeniach inwazyjnych i zapalnych, podczas gdy utrata receptora Siglec-14 związana z polimorfizmem fuzyjnym SIGLEC-5/14 i nadekspresja receptora Siglec-5 promuje immunosupresję i koreluje z niską sekrecją cytokin zapalnych [239]. Zgodnie z tym, funkcja receptora Siglec-14 u osób z genotypem SIGLEC-5/14^{+/+} związana jest z przeciwdziałaniem sygnalizacji supresyjnej aktywowanej przez receptor Siglec-5 [239]. Ta zależność została opisana w przebiegu chorób inwazyjnych i zapalnych, ale dane dotyczące funkcji sparowanych receptorów Siglec w przebiegu nowotworów są ograniczone [240, 241, 242]. Dane literaturowe sugerują, że regulacja nadzoru immunologicznego z udziałem receptorów Siglec zależy również od ekspresji specyficznych ligandów dla tych receptorów. Wzór sialilacji glikoprotein w komórkach nowotworowych jest wysoce niejednorodny i charakterystyczny dla określonego typu tkanki nowotworowej, a także określa typy zaangażowanych subpopulacji komórek odpornościowych wykazujących ekspresję receptorów Siglec. Wykazano, że nowotwory płuc i czerniaki wykazują ekspresję sialoglikanów rozpoznawanych i wiązanych przez receptory Siglec-7 i Siglec-9 [237, 243, 244]. Wśród ludzkich ligandów, sialowana mucyna-1, która wiąże Siglec-9, osłabia odporność przeciwnowotworową w makrofagach związanych z nowotworami piersi, podczas gdy podanie przeciwciała ukierunkowanego Siglec-9 w neutrofilach przywraca funkcje efektorowe tych komórek w obecności komórek nowotworowych [245]. Oprócz receptora Siglec-9, makrofagi wykazują ekspresję receptorów Siglec-5/14, Siglec-7 i Siglec-10, które posiadają szerokie spektrum wiązania sialoglikanów, a tym samym zwiększają rolę osi kwas sialowy-Siglec w przeciwnowotworowym mechanizmie regulacyjnym nadzoru immunologicznego [246, 247, 248].

Mimo że w niniejszej rozprawie nie analizowano wzoru sialilacji powierzchniowych glikoprotein i glikolipidów w badanych komórkach nowotworowych a prezentowane badania nie dotyczyły funkcji receptorów Siglec w systemach bezpośredniej kokultury, zanotowane zmiany w ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 wydają się potwierdzać to zjawisko. W celu zbadania wpływu tamoksyfenu na wzór sialilacji błony komórkowej oceniono stopień wiązania receptorowych białek fuzyjnych Siglec-5/Fc i Siglec-14/Fc do komórek MCF-7 i MDA-MB-231 w badanych układach komórkowych (Ryciny 36-43). Ilościowa analiza metodą cytometrii przepływowej wykryła różnice w wiązaniu białek fuzyjnych Siglec/Fc w monokulturach i kokulturach komórek nowotworowych piersi. Ekspozycja na tamoksyfen zwiększała powinowactwo białek Siglec-5/Fc i Siglec-14/Fc w komórkach MCF-7 i MDA-MB-231, co może odzwierciedlać związane z kwasem sjalowym zmiany w błonach komórkowych. Liczne badania wykazały, że struktura glikokoniugatów błonowych jest zmienna i zależy od fazy podziału komórki a także wpływu ksenobiotyków [249, 250, 251, 252, 253, 254]. Właściwa sialilacja glikokoniugatów wynika ze zrównoważonej ekspresji i aktywności sjalotransferaz i sjalidaz katalizujących reakcje przyłączania lub odłączania kwasów sjalowych od łańcuchów cukrowych glikolipidów i glikoprotein [255]. Nieprawidłowa sialilacja jest ściśle związana z podwyższoną aktywnością sjalotransferaz, w tym ST3Gal1, STGal4, ST6-Gal1 i ST8Sia2, a zwiększona ekspresja ich produktów koreluje z niepomyślnym rokowaniem [248, 256]. Ponadto, Zhang i wsp. sugerują, że nieprawidłowa sialilacja związana z ekspresją i aktywnością sjalotransferazy ST8Sia2 w nowotworach negatywnie reguluje wytwarzanie mediatorów prozapalnych [257]. W większości nowotworów, w tym rakach piersi, hipersialilacja białek komórkowych zależna od wybranych sjalotransferaz jest mechanizmem promującym proces nowotworowy na drodze podtrzymania proliferacji i unikania apoptozy, indukcji angiogenezy i przerzutowania oraz nabywania lekooporności [258]. Jak opisano powyżej, zmiany wzoru sialilacji oraz aktywacja osi kwas sjalowy-receptor Siglec leży u podstaw immunotolerancji w procesie nowotworowym. Dane literaturowe zwracają uwagę na rolę receptora Siglec-5 w unikaniu odpowiedzi immunologicznej w przebiegu złośliwych nowotworów gleju, jednak rola aktywującego receptora Siglec-14 jest niejasna [259]. Dotychczasowe badania w dziedzinie biologii nowotworów nie potwierdziły udziału tego receptora w progresji nowotworowej, jednak powinowactwo do tych samych ligandów może sugerować, że sparowane receptory mogą przeciwdziałać sobie nawzajem i dostrajać równowagę między aktywacją a zahamowaniem procesu immunologicznego [260]. Otwartym pozostaje więc pytanie o rolę receptora Siglec-14 w procesie nowotworowym w pacjentów z zachowanym w profilu genetycznym wild type allelem SIGLEC14⁺. Wyniki uzyskane w

niniejszej rozprawie sugerują, że zmierzony przy użyciu komercyjnego startera wzrost ekspresji genu SIGLEC14 a także powinowactwo białka Siglec-14 do błon komórek nowotworowych piersi może mieć znaczenie w formowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Badania przeprowadzone w ramach powyższej pracy wpisują się w nurt poszukiwań nowych właściwości leków, które dotychczas stanowiły „złoty standard” leczenia chorób nowotworowych. Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że w komórkowym modelu raka piersi tamoksyfen wywierał efekt immunomodulacyjny, który wyrażał się zmianą profilu cytokin z jednoczesną polaryzacją fenotypu komórek linii THP-1. Przedstawionym efektem działania tamoksyfenu towarzyszyły zmiany ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 w monocytach na poziomie białek receptorowych i ich powinowactwa do komórek nowotworowych. Modulacyjne działanie tamoksyfenu potwierdziły również zmiany ekspresji transkryptów genów receptorów Siglec-5 i Siglec-14 oraz związanych z nimi elementów systemu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Zmiany ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 mogą być istotnym czynnikiem różnicującym w oddziaływaniach międzykomórkowych. Modyfikacje struktury błony komórek raka piersi narażonych na tamoksyfen w kontekście zróżnicowania wzoru sialilacji oraz interakcji z aktywującymi lub hamującymi receptorami kwasu sialowego z rodziny Siglec może być ważnym elementem mechanizmu nadzoru immunologicznego w procesie nowotworowym oraz przyczyniać się do weryfikacji terapii przeciwestrogenowej.

VI. WNIOSKI

1. Tamoksyfen hamował wzrost i potencjał migracyjny estrogenozależnych komórek raka piersi linii MCF-7 w warunkach monokultury i kokultury z monocytami linii THP-1.
2. W komórkowym modelu raka piersi tamoksyfen wywierał efekt immunomodulacyjny poprzez zmianę profilu cytokin i jednoczesną polaryzację fenotypu monocytów linii THP-1 w obecności komórek MCF-7 i MDA-MB-231.
3. Monocyty linii THP-1 hodowane w obecności estrogenozależnych komórek MCF-7 lub niezależnych od estrogenów komórek MDA-MB-231 wykazywały wzrost ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14.
4. Ekspozycja na tamoksyfen modulowała aktywność transkrypcyjną genów SIGLEC5, SIGLEC14, PTPN6, PTPN11 i DAP12 w monocytach linii THP-1 we wszystkich badanych układach komórkowych.
5. Tamoksyfen wpływa na zmiany ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 w monocytach i różnicuje ich powinowactwo do komórek nowotworowych MCF-7 oraz MDA-MB-231, co może mieć znaczenie w immunomodulacji mikrośrodowiska guza.

VII. STRESZCZENIE

Rak piersi należy do najczęściej występujących nowotworów złośliwych u kobiet. Wysoka heterogenność molekularna i morfologiczna warunkuje jego inwazyjność i pozwala ocenić rokowanie, a analiza genomu i proteomu komórek nowotworowych piersi jest podstawą wyboru optymalnego postępowania leczniczego. Ponadto, badania ostatnich lat wykazały, że mikrośrodowisko guza piersi jest ściśle związane z progresją nowotworu, a interakcja komórek nowotworowych z otoczeniem pełni kluczową rolę w angiogenezie, wzroście guza, przerzutowaniu, lekooporności i odpowiedzi immunologicznej. W procesie rozpoznawania biologicznego szczególną rolę przypisuje się sjalowanym glikanom błony komórkowej, a ich oddziaływanie ze swoistymi immunoreceptorami z rodziny Siglec jest jednym z mechanizmów regulacyjnych nadzoru immunologicznego. Wykazano, że interakcja między receptorami Siglec a elementami sjalomu komórek nowotworowych skutkuje tłumieniem lub aktywacją układu immunologicznego i może mieć kluczowe znaczenie w procesie progresji nowotworu. Sparowane receptory Siglec-5/14 charakteryzują się homologią struktury domeny zewnątrzkomórkowej i powinowactwem do tych samych ligandów, ale wewnątrzkomórkowe ścieżki przekazywania sygnału wskazują na przeciwstawną regulację odpowiedzi immunologicznej.

Selektywne modulatory receptorów estrogenowych, w tym tamoksyfen, są podstawą hormonoterapii estrogenozależnych raków piersi. Badania *in vitro* i obserwacje kliniczne wykazały, że oprócz efektów przeciwnowotworowych ściśle związanych z mechanizmem działania leku, tamoksyfen wpływa również na aktywność układu immunologicznego. Ma to szczególne znaczenie ze względu na potencjał immunogeny komórek nowotworowych i ich interakcję ze składnikami mikrośrodowiska.

Celem pracy była ocena wpływu tamoksyfenu na aktywność komórek układu immunologicznego na przykładzie monocytów oraz udział sparowanych receptorów Siglec-5/14 w procesie nadzoru immunologicznego w komórkowym modelu raka piersi.

W celu odwzorowania mikrośrodowiska guza, badania przeprowadzono w oparciu o kokultury monocytów linii THP-1 z estrogenozależnymi komórkami raka piersi MCF-7 lub niezależnymi od estrogenów komórkami MDA-MB-231. W wyniku ekspozycji na tamoksyfen w dawce 10 μM zaobserwowano zmniejszenie wzrostu i potencjału migracyjnego komórek MCF-7. Działania cytotoksycznego nie obserwowano w hodowli komórek MDA-MB-231. Ponadto, tamoksyfen wywierał efekt immunomodulacyjny, który wyrażał się wzrostem produkcji cytokin prozapalnych z jednoczesną polaryzacją fenotypu monocytów THP-1 hodowanych w obecności komórek MCF-7 lub MDA-MB-231. Przedstawionym zmianom w analizowanych

komórkach towarzyszył wzrost ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14. Ekspozycja na tamoksyfen modulowała również aktywność transkrypcyjną genów receptorów Siglec-5 i Siglec-14 oraz związanych z nimi molekuł sygnalizacyjnych PTPN6, PTPN11 i DAP12 w monocytach THP-1 we wszystkich badanych układach komórkowych. Poza tym, tamoksyfen zwiększał wiązanie białek fuzyjnych Siglec-5 i Siglec-14 do badanych komórek nowotworowych piersi, co sugeruje zmiany wzoru sjalilacji błony komórkowej.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki sugerują, że tamoksyfen reguluje nadzór immunologiczny poprzez promowanie immunofenotypu prozapalnego monocytów w nowotworach piersi niezależnie od ich zależności od estrogenów. Zmiany ekspresji sparowanych receptorów Siglec mogą stanowić mechanizm regulacyjny genetycznie uwarunkowanej odpowiedzi immunologicznej oraz uczestniczyć w zależnej od tamoksyfenu immunomodulacji mikrośrodowiska guza. Analiza profilu receptorów Siglec, zwłaszcza ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14, może być ważnym narzędziem do prognozowania progresji nowotworu oraz weryfikacji strategii terapeutycznej i jej wpływu na mikrośrodowisko raka piersi.

VIII. ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer among women. A high degree of molecular and morphological heterogeneity is associated with malignancy and prognosis of the tumor, where genome and proteome analysis of cancer cells are the basis of treatment. In addition, in recent years studies have shown that tumor microenvironment in breast cancer is closely related to tumor progression and the interactions between tumor cells and microenvironment affects angiogenesis, tumor growth, metastasis, drug resistance and immune response. Sialylated glycans on cell membranes play a significant role in the process of biological recognition, and their interactions with specific immunoreceptors of the Siglec family are one of the regulatory mechanisms of immunosurveillance. The interaction between Siglec receptors and the sialome of cancer cells result in suppression or activation of the immune system and may be crucial in tumor progression. The paired Siglec-5/14 receptors share structural homology of the extracellular domain and affinity for the same ligands, but demonstrate different intracellular signal transduction pathways which induce opposite immune response. Selective modulators of estrogen receptors, including tamoxifen, are the basis of treatment for estrogen-dependent breast cancers. Furthermore, *in vitro* studies and clinical observations have shown that tamoxifen affects the activity of the immune system. This is important due to the immunogenic potential of cancer cells and their interactions with the components of the microenvironment. The aim of the study was to evaluate the effect of tamoxifen on the activity of the immune system cells on the example of monocytes and the involvement of paired Siglec-5/14 receptors in the process of immune surveillance in a cellular *in-vitro* breast cancer model. In order to imitate tumor microenvironment, the study was based on co-cultures of THP-1 monocytes with estrogen-dependent MCF-7 breast cancer cells and estrogen-independent MDA-MB-231 breast cancer cells. As a result of tamoxifen exposure at a dose of 10 μ M, a decrease in growth and migration potential of MCF-7 cells were observed. No cytotoxic effect was observed in MDA-MB-231 cell culture. In addition, tamoxifen induced the immunomodulatory effect, which was expressed by an increase in production of pro-inflammatory cytokines and a simultaneous change of THP-1 monocytes phenotype cultured in the presence of MCF-7 or MDA-MB-231 cells. The presented changes in the analyzed cells showed an increase in expression of paired Siglec-5/14 receptors. Exposure to tamoxifen also modulated the transcriptional activity of the Siglec-5 and Siglec-14 receptor genes and modulated associated signaling molecules PTPN6, PTPN11 and DAP12 in THP-1 monocytes in all studied cell models. Moreover, tamoxifen increased the binding of the Siglec-5 and

Siglec-14 fusion proteins in the studied breast cancer cells, which suggests changes in the sialylation pattern of the cells membrane.

The results presented in this study suggest that tamoxifen regulates immune surveillance by promoting the pro-inflammatory immunophenotype of monocytes in breast cancers unrelated to their estrogen dependence. Changes in the expression of paired Siglec receptors may be a regulatory mechanism of genetically conditioned immune response and participate in a tamoxifen-dependent immunomodulation of the tumor microenvironment. The analysis of the Siglec receptors profile, especially the expression of paired Siglec-5/14 receptors, may be an important tool not only for predicting tumor progression, but also to verify therapeutic strategies and its impact on the breast cancer microenvironment.

IX. Wykaz tabel i rysunków

- Tabela 1.** Zespoły genetyczne zwiększające ryzyko zachorowania na raka piersi.
- Tabela 2a.** Klasyfikacja TNM raka piersi określająca cechą T (guz pierwotny)
- Tabela 2b.** Klasyfikacja TNM raka piersi określająca cechą N (przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych) oraz cechą M (przerzuty odległe)
- Tabela 3.** Podtypy molekularne raka piersi.
- Tabela 4.** Podział, dystrybucja i rola receptorów z rodziny Siglec.
- Rycina 1.** Zachorowalność na nowotwór złośliwy piersi u kobiet w Polsce w latach 2005-2020.
- Rycina 2.** Zachorowalność na raka piersi w Polsce w latach 2011-13 w zależności od wieku.
- Rycina 3.** Zachorowalność na raka piersi w Wielkiej Brytanii w latach 2006-2008 w zależności od wieku.
- Rycina 4.** Stopnie zaawansowania klinicznego raka piersi.
- Rycina 5.** Rodzina receptorów Siglec występujących u człowieka.
- Rycina 6.** Ekspresja receptorów Siglec w układzie krwiotwórczym człowieka
- Rycina 7.** Ścieżki sygnalizacyjne aktywujących i hamujących receptorów błonowych receptorów związanych z cytozolowymi receptorami ITIM i ITAM.
- Rycina 8.** Najczęściej występujące formy kwasu sjałowego w organizmach ssaków.
- Rycina 9.** Interakcje *cis* (A) i interakcje *trans* (B) receptorów Siglec.
- Rycina 10.** Sekwencja genowa Siglec-14. Nukleotydowa i aminokwasowa sekwencja ludzkiego receptora Siglec-14 (A). Porównanie sekwencji receptorów Siglec 14 i Siglec 5 (B)
- Rycina 11.** Regulacja odpowiedzi immunologicznej przez sparowane receptory Siglec-5/14
- Rycina 12.** Komórki MCF-7 w hodowli 48 godzin po wysianiu; pasaż 12.
- Rycina 13.** Komórki MDA-MB-231 w hodowli 24 godziny po wysianiu; pasaż 13.
- Rycina 14.** Komórki THP-1 w hodowli 24 godziny po wysianiu (A) i po 48 godzinnej inkubacji z 12-mirystynian-13-octanem forbolu (B).

- Rycina 15.** Hodowle komórek MCF-7, MDA-MB-231 i THP-1 w warunkach monokultury (A) i kokultury (B) poddanych 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen.
- Rycina 16.** Przygotowanie próbki dla testu „gojenia rany” z użyciem dwukomorowego insertu silikonowego Ibidi (A). Płytką 6-dołkowa z wysianymi komórkami nowotworowymi sutka w insertach Ibidi (B).
- Rycina 17.** Analiza przeżywalności komórek raka piersi linii MCF-7 po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen w oparciu o test redukcji MTT.
- Rycina 18.** Analiza przeżywalności komórek raka piersi linii MDA-MB-231 po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen w oparciu o test redukcji MTT.
- Rycina 19.** Analiza przeżywalności monocytów linii THP-1 po 24 godzinnej ekspozycji na tamoksyfen w oparciu o test redukcji MTT.
- Rycina 20.** Wpływ tamoksyfenu na potencjał migracyjny komórek MCF-7. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające proces „zarastania rany” w monokulturze komórek MCF-7 lub w kokulturze z monocytami linii THP-1.
- Rycina 21.** Wpływ tamoksyfenu na potencjał migracyjny komórek MCF-7. Analiza pola powierzchni „rany” w trakcie 24 godzinnego doświadczenia.
- Rycina 22.** Wpływ tamoksyfenu na potencjał migracyjny komórek MDA-MB-231.
- Rycina 23.** Wpływ tamoksyfenu na potencjał migracyjny komórek MDA-MB-231. Analiza pola powierzchni „rany” w trakcie 24 godzinnego doświadczenia.
- Rycina 24.** Stężenie TNF α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-8 (D), IL-10 (E) i IL-12p70 (F) w monokulturach i kokulturach monocytów linii THP-1.
- Rycina 25.** Wpływ mirystynianu-13-octanu forbolu (PMA) na ekspresję CD68 w monocytach linii THP-1.
- Rycina 26.** Wpływ tamoksyfenu na ekspresję CD68 w monocytach linii THP-1.
- Rycina 27.** Wpływ tamoksyfenu na ekspresję CD68 w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka piersi MCF-7.
- Rycina 28.** Wpływ tamoksyfenu na ekspresję CD68 w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka piersi MDA-MB-231.
- Rycina 29.** Wpływ tamoksyfenu na ekspresję arginazy-1 w monocytach linii THP-1.
- Rycina 30.** Wpływ tamoksyfenu na ekspresję arginazy-1 w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka piersi MCF-7.
- Rycina 31.** Wpływ tamoksyfenu na ekspresję arginazy-1 w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka piersi MDA-MB-231.

- Rycina 32.** Wpływ tamoksyfenu na ekspresję receptorów Siglec-5/14 w monocytach linii THP-1.
- Rycina 33.** Wpływ tamoksyfenu na ekspresję receptorów Siglec-5/14 w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka piersi MCF-7.
- Rycina 34.** Wpływ tamoksyfenu na ekspresję receptorów Siglec-5/14 w monocytach linii THP-1 w hodowli z komórkami raka piersi MDA-MB-231.
- Rycina 35.** Poziom transkryptów genów SIGLEC5, SIGLEC14, PTPN6, PTPN11 i TYROBP w monokulturach i kokulturach monocytów linii THP-1.
- Rycina 36.** Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-5/Fc z komórkami raka sutka MCF-7.
- Rycina 37.** Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-5/Fc z komórkami raka sutka MCF-7 w hodowli z monocytami linii THP-1.
- Rycina 38.** Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-5/Fc z komórkami raka sutka MDA-MB-231.
- Rycina 39.** Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-5/Fc z komórkami raka sutka MDA-MB-231 w hodowli z monocytami linii THP-1.
- Rycina 40.** Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-14/Fc z komórkami raka sutka MCF-7.
- Rycina 41.** Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-14/Fc z komórkami raka sutka MCF-7 w hodowli z monocytami linii THP-1.
- Rycina 42.** Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-14/Fc z komórkami raka sutka MDA-MB-231.
- Rycina 43.** Wpływ tamoksyfenu na wiązanie białka fuzyjnego Siglec-14/Fc z komórkami raka sutka MDA-MB-231 w hodowli z monocytami linii THP-1.

LITERATURA

1. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Breast Cancer Treatment (Adult) (PDQ®): Patient Version. 2022 Oct 6. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-.
2. Lacroix M., Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Dec;13(4):1033-67.
3. National Cancer Institute. "Metastatic Cancer: Questions and Answers" 2004. Archived from the original on 27 August 2008. Retrieved 6 February 2008.
4. Saunders C., Jassal S., *Breast cancer* (1. ed.). Oxford: Oxford University Press. 2009, p. Chapter 13. ISBN 978-0-19-955869-8. Archived from the original on 25 October 2015.
5. Lo A.C., Klee C.G., Banerjee M., Omar S., Khaled H., Eissa S., Hablas A., Douglas J.A., Alford S.H., Merajver S.D., Soliman A.S., Molecular epidemiologic features of inflammatory breast cancer: a comparison between Egyptian and US patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Nov;112(1):141-7.
6. Breast Cancer: Breast Cancer in Young Women WebMD. Retrieved on September 9, 2009.
7. Dzikowska J., Wojeciechowska U., Olasek P., Santos F.C., Michałek I., Nowotwory złośliwe w Polsce w 2019 roku, w: *Nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów*. Warszawa 2021.
8. American Cancer Society, What Are the Key Statistics for Breast Cancer? Archived from the original on January 5, 2008. Retrieved 2008-02-03.
9. Yedjou C.G., Sims J.N., Miele L., Noubissi F., Lowe L., Fonseca D.D., Alo R.A., Payton M., Tchounwou P.B., Health and Racial Disparity in Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1152:31-49.
10. Ong, K.R., Howell A., Morrow M., Jordan V.C., *Managing Breast Cancer Risk*. 1st Edition. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc. *Breast Cancer Res* 7, 2005, 105.
11. Gage M., Wattendorf D., Henry L.R., Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes. *J Surg Oncol*. 2012 Apr 1;105(5):444-51.

-
12. Morris J.L., Gordon O.K., Positive Results: Making the Best Decisions When You're at High Risk for Breast or Ovarian Cancer. Amherst, N.Y.: Prometheus Books. 2010. ISBN 978-1-59102-776-8.
 13. Chen S., Parmigiani G., Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* 2007 Apr 10;25(11):1329-33.
 14. Shield K.D., Soerjomataram I., Rehm J., Alcohol Use and Breast Cancer: A Critical Review. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research.* 40 (6): 1166–1181. 2016, ISSN 1530-0277.
 15. Protani M., Coory M., Martin J.H., Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Oct;123(3):627-35.
 16. Ewertz M., Jensen M.B., Gunnarsdóttir K.Á., Højris I., Jakobsen E.H., Nielsen D., Stenbygaard L.E., Tange U.B., Cold S., Effect of obesity on prognosis after early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Jan 1;29(1):25-31.
 17. Priceman S.J., Kujawski M., Shen S., Cherryholmes G.A., Lee H., Zhang C., Kruper L., Mortimer J., Jove R., Riggs A.D., Yu H., Regulation of adipose tissue T cell subsets by Stat3 is crucial for diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Aug 6;110(32):13079-84.
 18. Brody J.G., Moysich K.B., Humblet O., Attfield K.R., Beehler G.P., Rudel R.A., Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies, 2007. *Cancer.* 109 (12 Suppl): 2667–711.
 19. McTiernan A., Thomas D.B., Evidence for a protective effect of lactation on risk of breast cancer in young women. Results from a case-control study. *American Journal of Epidemiology.* 124 (3): 353–8. 1986.
 20. Byers T., Graham S., Rzepka T., Marshall J., Lactation and breast cancer. Evidence for a negative association in premenopausal women. *American Journal of Epidemiology.* 121 (5): 664–74. 1985.
 21. What Are the Risk Factors for Breast Cancer? American Cancer Society. 3 October 2006. Retrieved 30 March 2006.

-
22. Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Breast Disorders: Breast Cancer. 2003. Archived from the original on 2 October 2011. Retrieved 5 February 2008.
 23. . Siu A.L., Screening for Breast Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. 2009. Archived from the original on 2 January 2013. Retrieved 24 December 2012.
 24. Kösters J.P., Gøtzsche P.C., Regular self-examination or clinical examination for early detection of breast cancer. The Cochrane Database of Systematic Reviews (2): CD003373. 2003. CD003373.
 25. Kordek R., Jassem J., Krzakowski M., Jeziorski A., Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy" Nowotwory. Journal of Oncology 2004;54(2):171, s. 208-209.
 26. Liberman L., Menell J.H., Illustrated breast imaging reporting and data system BI-RADS. 3rd ed., vol. 12. American College of Radiology; 1998. 27:216.
 27. The breast-health experts the Mayo Clinic Caner, The Mayo Clinic Breast Cancer Book. RosettaBooks. 2012-11-16. p. 124. ISBN 9780795334306.
 28. Reynolds H., The Big Squeeze: a social and political history of the controversial mammogram. Cornell University Press. 2012. p. 77. ISBN 978-0801465567.
 29. Program Profilaktyki Raka Piersi, Dostępny w: <https://www.gov.pl/web/zdrowie/program-profilaktyki-raka-piersi-mammografia->
 30. Berg W.A., Blume J.D., Cormack J.B., Mendelson E.B., Lehrer D., Böhm-Vélez M., Pisano E.D., Jong R.A., Evans W.P., Morton M.J., Mahoney M.C., Larsen L.H., Barr R.G., Farria D.M., Marques H.S., Boparai K., Combined screening with ultrasound and mammography vs mammography alone in women at elevated risk of breast cancer. 2008. JAMA. 299 (18): 2151–63.
 31. Berg W.A., Zhang Z., Lehrer D., Jong R.A., Pisano E.D., Barr R.G., Böhm-Vélez M., Mahoney M.C., Evans W.P., Larsen L.H., Morton M.J., Mendelson E.B., Farria D.M., Cormack J.B., Marques H.S., Adams A., Yeh N.M., Gabrielli G., Detection of breast cancer with addition of annual screening ultrasound or a single screening MRI to mammography in women with elevated breast cancer risk. JAMA. 307 (13): 1394–404. 2012.
 32. Gosciniak C.P., Berman C.G., Clark R.A., Magnetic Resonance Imaging of the Breast. Cancer Control. 8 (5): 399–406. 2001.

-
33. Morrow M., Magnetic resonance imaging in breast cancer: one step forward, two steps back? *JAMA*. 292 (22): 2779–80. 2004.
 34. Hrung J.M., Sonnad S.S., Schwartz J.S., Langlotz C.P., Accuracy of MR imaging in the work-up of suspicious breast lesions: a diagnostic meta-analysis. 1990. *Academic Radiology*. 6 (7): 387–97.
 35. Górski B., A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families. *International Journal of Cancer*. 110 (5), 2004, s. 683–686.
 36. Pruthi S., Gostout B.S., Lindor N.M., Identification and Management of Women with BRCA Mutations or Hereditary Predisposition for Breast and Ovarian Cancer". *Mayo Clinic Proceedings*. 85 (12): 1111–1120.
 37. Nassar A., Core Needle Biopsy Versus Fine Needle Aspiration Biopsy in Breast. A Historical Perspective and Opportunities in the Modern Era *Diagn. Cytopathol*. 2011;39:380–388.
 38. Bruening W., Fontanarosa J., Systematic Review: Comparative Effectiveness of Core-Needle and Open Surgical Biopsy to Diagnose Breast Lesions *Ann Intern Med*. 2010; 152: 238-246.
 39. Townsend C.M.J.R., Beauchamp R.D., Evers B.M., Sabiston Textbook of Surgery. 17th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, Diseases of the breast. Needle Localization Breast Biopsy. 2004. ISBN 0-7216-0409-9.
 40. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Breast tumours. Lyon. International Agency for Research on Cancer; 2019. WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol.2, s.10.
 41. Amin M.B., Greene F.L., Edge S.B., Compton C.C., Gershenwald J.E., Brookland R.K., Meyer L., Gress D.M., Byrd D.R., Winchester D.P., The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):93-99.
 42. Damjanov I., Fang F., Cancer Grading Manual. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 978-3-642-34516-6. Damjanov I Fan 2013, s. 1–5.
 43. Tsang J.Y.S., Tse G.M., Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances In Anatomic Pathology*. 27 (1): 27–35. 2020. ISSN 1072-4109.

-
44. Nguyen H.T., Trouillon R., Matsuoka S., Fiche M., de Leval L., Bisig B., Microfluidics-assisted fluorescence in situ hybridization for advantageous human epidermal growth factor receptor 2 assessment in breast cancer. *Lab Invest.* 97 (1): 93–103. 2017.
 45. Ross J.S., Hatzis C., Symmans W.F., Pusztai L., Hortobagyi G.N., Commercialized Multigene Predictors of Clinical Outcome for Breast Cancer. *The Oncologist.* 13 (5): 477–493. 2008.
 46. Albain K.S., Paik S., Van't Veer L., Prediction of adjuvant chemotherapy benefit in endocrine responsive, early breast cancer using multigene assays. *The Breast.* 18: S141–S145. 2009.
 47. Veronesi U., Saccozzi R., Del Vecchio M., Banfi A., Clemente C., De Lena M., Gallus G., Greco M., Luini A., Marubini E., Muscolino G., Rilke F., Salvadori B., Zecchini A., Zucali R., Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast. 1981. *N Engl J Med.* 2;305(1), s.6-11.
 48. Storino A., Drews R.E., Tawa N.E., Malignant Cutaneous Adnexal Tumors and Role of SLNB. *Journal of the American College of Surgeons.* 2021. 232 (6): s.889–898.
 49. DePolo J., Radiation Therapy. *Breastcancer.org.* Archived from the original on 17 November 2015. Retrieved 17 November 2015.
 50. Ngan R.K.C., Adjuvant Chemotherapy for High-risk Node-positive Breast Cancer: a Tale of Three Generations. 2011. *Hong Kong J Radiol.* 14(Suppl): s.46-55.
 51. Syn N.L., Teng M.W., Mok T.S., Soo R.A., De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet.* 2017. *Oncology.* 18 (12): s.731–s.741.
 52. Mokbel K., The evolving role of aromatase inhibitors in breast cancer. *International journal of clinical oncology.* 7 (5), s. 279–83, 2002.
 53. Simpson E.R., Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Sep;86(3-5):225-30.
 54. Martinkovich S., Shah D., Planey S.L., Arnott J.A. Selective estrogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility. *Clin Interv Aging.* 2014 Aug 28;9:1437-52.
 55. Rosano C., Stec M.E., Lappano R., Maggiolini M., Structure-based approach for the discovery of novel selective estrogen receptor modulators. *Curr Med Chem.* 2011;18(8):1188-94.

-
56. Riggs B.L., Hartmann L.C., Selective estrogen-receptor modulators - mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med.* 2003 Feb 13;348(7):618-29.
 57. Vogel V.G., The NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene STAR trial. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009 Jan;9(1):51-60.
 58. Jordan V.C., Fourteenth Gaddum Memorial Lecture. A current view of tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer. *Br J Pharmacol.* 1993 Oct;110(2):507-17.
 59. Romero S.A., Young K., Hickey M., Su H.I., Levonorgestrel intrauterine system for endometrial protection in women with breast cancer on adjuvant tamoxifen. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Dec 21;12(12):CD007245.
 60. Sanchez-Spitman A.B., Swen J.J., Dezentje V.O., Moes D.J.A.R., Gelderblom H., Guchelaar H.J., Clinical pharmacokinetics and pharmacogenetics of tamoxifen and endoxifen. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2019 Jun;12(6):523-536.
 61. Ahmad A., Shahabuddin S., Sheikh S., Kale P., Krishnappa M., Rane R.C., Ahmad I. Endoxifen, a new cornerstone of breast cancer therapy: demonstration of safety, tolerability, and systemic bioavailability in healthy human subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2010 Dec;88(6):814-7.
 62. Shang Y., Hu X., DiRenzo J., Lazar M.A., Brown M.. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell.* 2000 Dec 8;103(6):843-52.
 63. Hurtado A., Holmes K.A., Geistlinger T.R., Hutcheson I.R., Nicholson R.I., Brown M., Jiang J., Howat W.J., Ali S., Carroll J.S., Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature.* 2008 Dec 4;456(7222):663-6.
 64. Davies C., Pan H., Godwin J., Gray R., Arriagada R., Raina V., Abraham M., Medeiros Alencar V.H., Badran A., Bonfill X., Bradbury J., Clarke M., Collins R., Davis S.R., Delmestri A., Forbes J.F., Haddad P., Hou M.F., Inbar M., Khaled H., Kielanowska J., Kwan W.H., Mathew B.S., Mitra I., Müller B., Nicolucci A., Peralta O., Pernas F., Petruzelka L., Pienkowski T., Radhika R., Rajan B., Rubach M.T., Tort S., Urrútia G., Valentini M., Wang Y., Peto R., Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter ATLAS Collaborative Group. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet.* 2013 Mar 9;381(9869):805-16.

-
65. Corriden R., Hollands A., Olson J., Derieux J., Lopez J., Chang J.T., Gonzalez D.J., Nizet V., Tamoxifen augments the innate immune function of neutrophils through modulation of intracellular ceramide. *Nat Commun.* 2015 Oct 13;6:8369.
 66. Komi J., Lassila O., Toremifene increases the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on MCF-7 breast cancer cells and Jurkat cells. *Scand J Immunol.* 2000 Jan;51(1):73-8.
 67. Behjati S., Frank H.M., The effects of tamoxifen on immunity. *Curr Med Chem.* 2009;16(24):3076-80.
 68. Komi J, Lassila O., Antioestrogens enhance tumour necrosis factor receptor 2 (TNF-R2) expression and TNF-R2-mediated proliferation in activated T cells. *Scand J Immunol.* 1998 Sep;48(3):254-60.
 69. Mitri Z., Constantine T., O'Regan R., The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract.* 2012;2012:743193.
 70. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L., Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
 71. Albanell J., Codony J., Rovira A., Mellado B., Gascon P., Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 532, s. 253–268, 2003.
 72. Jahanzeb M., Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-positive breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2008 Aug;8(4):324-33.
 73. Gianni L., Pienkowski T., Im Y.H., Roman L., Tseng L.M., Liu M.C., Lluch A., Staroslawska E., de la Haba-Rodriguez J., Im S.A., Pedrini J.L., Poirier B., Morandi P., Semiglazov V., Srimuninnimit V., Bianchi G., Szado T., Ratnayake J., Ross G., Valagussa P., Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012 Jan;13(1):25-32.
 74. Osborne C.K., Bardou V., Hopp T.A., Chamness G.C., Hilsenbeck S.G., Fuqua S.A., Wong J., Allred D.C., Clark G.M., Schiff R., Role of the estrogen receptor coactivator AIB1

-
- (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Mar 5;95(5):353-61.
75. Hanahan D., Weinberg R.A., The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
76. Siddle H.V., Kaufman J., A tale of two tumours: comparison of the immune escape strategies of contagious cancers. *Mol Immunol.* 2013 Sep;55(2):190-3.
77. Gilmore T.D., Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006 Oct 30;25(51):6680-4.
78. Vlahopoulos S.A., Aberrant control of NF-κB in cancer permits transcriptional and phenotypic plasticity, to curtail dependence on host tissue: molecular mode. *Cancer Biol Med.* 2017 Aug;14(3):254-270.
79. Vlahopoulos S.A., Cen O., Hengen N., Agan J., Moschovi M., Critselis E., Adamaki M., Bacopoulou F., Copland J.A., Boldogh I., Karin M., Chrousos G.P., Dynamic aberrant NF-κB spurs tumorigenesis: a new model encompassing the microenvironment. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Aug;26(4):389-403.
80. Igney F.H., Krammer P.H., Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol.* 2002 Jun;71(6):907-20.
81. Kaneko K., Ishigami S., Kijima Y., Funasako Y., Hirata M., Okumura H., Shinchi H., Koriyama C., Ueno S., Yoshinaka H., Natsugoe S., Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. *BMC Cancer.* 2011 Oct 20;11:454.
82. Woo S.R., Corrales L., Gajewski T.F., The STING pathway and the T cell-inflamed tumor microenvironment. *Trends Immunol.* 2015 Apr;36(4):250-6.
83. Ye X.Z., Yu S.C., Bian X.W., Contribution of myeloid-derived suppressor cells to tumor-induced immune suppression, angiogenesis, invasion and metastasis. *J Genet Genomics.* 2010 Jul;37(7):423-30.
84. Whiteside T.L., Herberman R.B., The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol.* 1995 Oct;7(5):704-10.
85. Klöß S., Chambron N., Gardlowski T., Arseniev L., Koch J., Esser R., Glienke W., Seitz O., Köhl U., Increased sMICA and TGFβ₁ levels in HNSCC patients impair NKG2D-

-
- dependent functionality of activated NK cells. *Oncoimmunology*. 2015 May 29;4(11):e1055993.
86. Vitale M., Cantoni C., Pietra G., Mingari M.C., Moretta L., Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol*. 2014 Jun;44(6):1582-92.
87. Baginska J., Viry E., Paggetti J., Medves S., Berchem G., Moussay E., Janji B., The critical role of the tumor microenvironment in shaping natural killer cell-mediated anti-tumor immunity. *Front Immunol*. 2013 Dec 25;4:490.
88. Baginska J., Viry E., Paggetti J., Medves S., Berchem G., Moussay E., Janji B., The critical role of the tumor microenvironment in shaping natural killer cell-mediated anti-tumor immunity. *Front Immunol*. 2013 Dec 25;4:490.
89. Chang C.I., Liao J.C., Kuo L., Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res*. 2001 Feb 1;61(3):1100-6.
90. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M., The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004 Dec;25(12):677-86.
91. Hao N.B., Lü M.H., Fan Y.H., Cao Y.L., Zhang Z.R., Yang S.M., Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:948098.
92. Lamagna C., Aurrand-Lions M., Imhof B.A., Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2006 Oct;80(4):705-13.
93. Sica A., Schioppa T., Mantovani A., Allavena P., Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006 Apr;42(6):717-27.
94. Guo C., Buranich A., Sarkar D., Fisher P.B., Wang X.Y., The role of tumor-associated macrophages in tumor vascularization. *Vasc Cell*. 2013 Dec 6;5(1):20. Erratum in: *Vasc Cell*. 2014 Feb 10;6(1):2.
95. Gocheva V., Wang H.W., Gadea B.B., Shree T., Hunter K.E., Garfall A.L., Berman T., Joyce J.A., IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev*. 2010 Feb 1;24(3):241-55.

-
96. Bottazzi B., Colotta F., Sica A., Nobili N., Mantovani A., A chemoattractant expressed in human sarcoma cells (tumor-derived chemotactic factor, TDCF) is identical to monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor (MCP-1/MCAF) *Int J Cancer*. 1990;45:795–797.
 97. Ito Y., Ishiguro H., Kobayashi N., Hasumi H., Watanabe M., Yao M., Uemura H., Adipocyte-derived monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate*. 2015;75:1009–1019. 2
 98. Qian B.Z., Li J., Zhang H., Kitamura T., Zhang J., Campion L.R., Kaiser E.A., Snyder L.A., Pollard J.W., CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011;475:222–225.
 99. Loberg R.D., Ying C., Craig M., Yan L., Snyder L.A., Pienta K.J., CCL2 as an important mediator of prostate cancer growth in vivo through the regulation of macrophage infiltration. *Neoplasia*. 2007;9:556–562.
 100. Fridlender Z.G., Kapoor V., Buchlis G., Cheng G., Sun J., Wang L.C., Singhal S., Snyder L.A., Albelda S.M., Monocyte chemoattractant protein-1 blockade inhibits lung cancer tumor growth by altering macrophage phenotype and activating CD8+ cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44:230–237.
 101. Teng K.Y., Han J., Zhang X., Hsu S.H., He S., Wani N.A., Barajas J.M., Snyder L.A., Frankel W.L., Caligiuri M.A., Blocking the CCL2-CCR2 axis using CCL2-neutralizing antibody is an effective therapy for hepatocellular cancer in a mouse model. *Mol Cancer Ther*. 2017;16:312–322.
 102. Raman D., Baugher P.J., Thu Y.M., Richmond A., Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett*. 2007 Oct 28;256(2):137-65.
 103. Jinushi M., Chiba S., Yoshiyama H., Masutomi K., Kinoshita I., Dosaka-Akita H., Yagita H., Takaoka A., Tahara H., Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 26;108(30):12425-30.
 104. Granot Z., Henke E., Comen E.A., King T.A., Norton L., Benezra R., Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell*. 2011 Sep 13;20(3):300-14.
 105. Galdiero M.R., Bonavita E., Barajon I., Garlanda C., Mantovani A., Jaillon S., Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 2013 Nov;218(11):1402-10.

-
106. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G.S., Albelda S.M., Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009 Sep 8;16(3):183-94.
 107. Benevides L., da Fonseca D.M., Donate P.B., Tiezzi D.G., De Carvalho D.D., de Andrade J.M., Martins G.A., Silva J.S., IL17 Promotes Mammary Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment. *Cancer Res*. 2015 Sep 15;75(18):3788-99.
 108. Vicari A.P., Caux C., Trinchieri G., Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol*. 2002 Feb;12(1):33-42.
 109. Liang Y., Pan H.F., Ye D.Q., Tc17 Cells in Immunity and Systemic Autoimmunity. *Int Rev Immunol*. 2015;34(4):318-31.
 110. Bowers J.S., Nelson M.H., Kundimi S., Bailey S.R., Huff L.W., Schwartz K.M., Cole D.J., Rubinstein M.P., Paulos C.M., Dendritic Cells in Irradiated Mice Trigger the Functional Plasticity and Antitumor Activity of Adoptively Transferred Tc17 Cells via IL12 Signaling. *Clin Cancer Res*. 2015 Jun 1;21(11):2546-57.
 111. Speiser D.E., Ho P.C., Verdeil G., Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2016 Oct;16(10):599-611.
 112. Clemente C.G., Mihm M.C. Jr., Bufalino R., Zurrida S., Collini P., Cascinelli N., Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996 Apr 1;77(7):1303-10.
 113. Oldford S.A., Robb J.D., Codner D., Gadag V., Watson P.H., Drover S., Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *Int Immunol*. 2006 Nov;18(11):1591-602.
 114. Tosolini M., Kirilovsky A., Mlecnik B., Fredriksen T., Mauger S., Bindea G., Berger A., Bruneval P., Fridman W.H., Pagès F., Galon J., Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*. 2011 Feb 15;71(4):1263-71.
 115. Salmon H., Donnadieu E., Within tumors, interactions between T cells and tumor cells are impeded by the extracellular matrix. *Oncoimmunology*. 2012 Sep 1;1(6):992-994.

-
116. Kim H.J., Cantor H., CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. *Cancer Immunol Res.* 2014 Feb;2(2):91-8.
117. Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., Fehervari Z., Nomura T., Sakaguchi S., CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 2008 Oct 10;322(5899):271-5.
118. Schmidt A., Oberle N., Weiss E.M., Vobis D., Frischbutter S., Baumgrass R., Falk C.S., Haag M., Brügger B., Lin H., Mayr G.W., Reichardt P., Gunzer M., Suri-Payer E., Krammer P.H., Human regulatory T cells rapidly suppress T cell receptor-induced Ca(2+), NF-κB, and NFAT signaling in conventional T cells. *Sci Signal.* 2011 Dec 20;4(204):ra90.
119. Rodrigues E., Macauley M.S., Hypersialylation in cancer: modulation of inflammation and therapeutic opportunities. *Cancers (Basel)* 2018 Jun 18;10(6). pii: E207.
120. Crimeen-Irwin B., Scalzo K., Gloster S., Mottram P.L., Plebanski M., Failure of immune homeostasis—The consequences of under and over reactivity. *Curr. Drug Targets Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 2005, 5, 413–422.
121. Huntington N.D., Gray D.H., Immune homeostasis in health and disease. *Immunol. Cell Biol.* 2018, 96, 451–452.
122. Śliwa-Dominiak J., Deptuła w., Udział glikoprotein w odporności, *Postępy Biologii Komórki*, 2010, 37, 571-583.
123. Schnaar R.L., The Biology of Gangliosides. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2019;76:113-148.
124. Farmakopea Polska X, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa: Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, 2014, s. 4276, ISBN 978-83-63724-47-4.
125. Medus M.L., Gomez G.E., Zacchi L.F., Couto P.M., Labriola C.A., Labanda M.S., Bielsa R.C., Clérico E.M., Schulz B.L., Caramelo J.J., N-glycosylation Triggers a Dual Selection Pressure in Eukaryotic Secretory Proteins. *Sci Rep.* 2017 Aug 18;7(1):8788..
126. van Kooyk Y., Rabinovich G.A., Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):593-601.
127. Zhou X., Yang G., Guan F., Biological Functions and Analytical Strategies of Sialic Acids in Tumor. *Cells.* 2020 Jan 22;9(2):273.

-
128. Cragg S.J., Wagstaff M., Worwood M., Sialic acid and the microheterogeneity of human serum ferritin. *Clin Sci (Lond)*. 1980 Mar;58(3):259-62.
129. Wielgat P., Rogowski K., Niemirowicz-Laskowska K., Car H., Sialic Acid-Siglec Axis as Molecular Checkpoints Targeting of Immune System: Smart Players in Pathology and Conventional Therapy. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 19;21(12):4361.
130. Lim J., Sari-Ak D., Bagga T., Siglecs as Therapeutic Targets in Cancer. *Biology (Basel)*. 2021 Nov 13;10(11):1178.
131. Siddiqui S.S., Matar R., Merheb M., Hodeify R., Vazhappilly C.G., Marton J., Shamsuddin S.A., Al Zouabi H., Siglecs in Brain Function and Neurological Disorders. *Cells*. 2019 ;8(10):1125.
132. Brinkman-Van der Linden E. C., Angata T., CD33/Siglec-3 binding specificity, expression pattern, and consequences of gene deletion in mice. 2003. *Mol Cell Biol* 23(12): 4199-206.
133. Lock K., Zhang J., Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. 2004. *Immunobiology* 209(1-2): 199-207.
134. Varki A., Angata T., Siglecs-the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology*. 2006 Jan;16(1):1R-27R.
135. Patel N., Brinkman-Van der Linden E.C., OB-BP1/Siglec-6. a leptin- and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily." 1999. *J Biol Chem* 274(32): 22729-38.
136. Razi N., Varki A. Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. 1998. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7469-74.
137. Blasius A.L., Cella M., Maldonado J., Takai T., Colonna M., Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2474-6. Epub 2005 Nov 17.
138. Tomasello E., Vivier E., KARAP/DAP12/TYROBP: three names and a multiplicity of biological functions. *Eur J Immunol*. 2005 Jun;35(6):1670-7. Erratum in: *Eur J Immunol*. 2005 Sep;35(9):2776.

-
139. Burshtyn D.N., Yang W.Y.T., Long E.O., A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1. 1997. *J Biol Chem* 272(20):13066-72.
140. Olcese L., Lang P., Vely F., Cambiaggi A., Marguet D., Blery M., Hippen K.L., Biassoni R., Moretta A., Moretta L., Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. 1996. *J Immunol* 156(12):4531-4.
141. Vely F., Olivero S., Olcese L., Moretta A., Damen J.E., Liu L., Krystal G., Cambier J.C., Daeon M., Vivier E., Differential association of phosphatases with hematopoietic co-receptors bearing immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. 1997. *Eur J Immunol* 27(8):1994-2000.
142. Bruhns P., Vely F., Malbec O., Fridman W.H., Vivier E., Daeon M., Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by fcgamma RIIB. 2000. *J Biol Chem* 275(48):37357-64.
143. Linnartz B., Wang Y., Neumann H., Microglial immunoreceptor tyrosine-based activation and inhibition motif signaling in neuroinflammation. 2010. *Int J Alzheimers Dis* 2010.
144. Schauer R., Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J*. 2000 Jul-Sep;17(7-9):485-99.
145. Walter R.B., Investigational CD33-targeted therapeutics for acute myeloid leukemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018 Apr;27(4):339-348.
146. Rabinovich G.A., van Kooyk Y., Cobb B.A., Glycobiology of immune responses. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Apr;1253:1-15.
147. Aarnoudse C.A., Garcia Vallejo J.J., Saeland E., van Kooyk Y., Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol*. 2006 Feb;18(1):105-11.
148. Ferreira I.G., Pucci M., Venturi G., Malagolini N., Chiricolo M., Dall'Olio F., Glycosylation as a Main Regulator of Growth and Death Factor Receptors Signaling. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 15;19(2). pii: E580.
149. Powell L.D., Sgroi D., Sjoberg E.R., Stamenkovic I., Varki A., Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta carry N-linked oligosaccharides with alpha-2,6-linked sialic acids that are required for recognition. *J Biol Chem*. 1993 Apr 5;268(10):7019-27.
150. Yamaji T., Teranishi T., Alpey M.S., Crocker P.R., Hashimoto Y., A small region of the natural killer cell receptor, Siglec-7, is responsible for its preferred binding to alpha 2,8-disialyl and branched alpha 2,6-sialyl residues. A comparison with Siglec-9. *J Biol Chem*. 2002 Feb 22;277(8):6324-32. Epub 2001 Dec 10.

-
151. Munday J., Floyd H., Crocker P.R., Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. *J Leukoc Biol.* 1999 Nov;66(5):705-11.
 152. Crocker P.R., Paulson J.C., Varki A., Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2007 Apr;7(4):255-66.
 153. Crocker P.R., Freeman S., Gordon S., Kelm S., Sialoadhesin binds preferentially to cells of the granulocytic lineage. 1995. *J Clin Invest* 95(2):635-43.
 154. Crocker P.R., Gordon S., Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages. 1986. *J Exp Med* 164(6):1862-75.
 - 155 . Jones C., Virji M., Crocker P.R., Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Mol Microbiol.* 2003 Sep;49(5):1213-25.
 156. Biedermann B., Gil D., Analysis of the CD33-related siglec family reveals that Siglec-9 is an endocytic receptor expressed on subsets of acute myeloid leukemia cells and absent from normal hematopoietic progenitors. 2007. *Leuk Res* 31(2): 211-20.
 157. Doody G. M., Justement L.B., A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. 1995. *Science* 269(5221): 242-4.
 158. Monteiro V.G., Lobato C.S., Silva A.R., Medina D.V., de Oliveira M.A., Seabra S.H., de Souza W., DaMatta R.A., Increased association of *Trypanosoma cruzi* with sialoadhesin positive mice macrophages. *Parasitol Res.* 2005 Nov;97(5):380-5.
 159. Carlin, A. F., Lewis A.L., Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. 2007. *J Bacteriol* 189(4): 1231-7.
 - 160 . Monteiro V.G., Lobato C.S., Increased association of *Trypanosoma cruzi* with sialoadhesin positive mice macrophages. 2005. *Parasitol Res* 97(5): 380-5.
 - 161 . Avril T., Wagner, E.R., Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 7 mediates selective recognition of sialylated glycans expressed on *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides. 2006. *Infect Immun* 74(7): 4133-41.
 162. Stanczak M.A., Siddiqui S.S., Trefny M.P., Thommen D.S., Boligan K.F., von Gunten S., Tzankov A., Tietze L., Lardinois D., Heinzelmann-Schwarz V., von Bergwelt-Baildon M., Zhang W., Lenz H.J., Han Y., Amos C.I., Syedbasha M., Egli A., Stenner F., Speiser D.E., Varki A., Zippelius A., Läubli H., Self-associated molecular patterns mediate cancer immune evasion by engaging Siglecs on T cells. *J Clin Invest.* 2018 Nov 1;128(11):4912-4923.

-
163. Beatson R., Tajadura-Ortega V., Achkova D., Picco G., Tsourouktsoglou T.D., Klausung S., Hillier M., Maher J., Noll T., Crocker P.R., Taylor-Papadimitriou J., Burchell J.M., The mucin MUC1 modulates the tumor immunological microenvironment through engagement of the lectin Siglec-9. *Nat Immunol.* 2016 Nov;17(11):1273-1281
164. Wu Y., Huang W., Xie Y., Wang C., Luo N., Chen Y., Wang L., Cheng Z., Gao Z., Liu S., Siglec-9, a Putative Immune Checkpoint Marker for Cancer Progression Across Multiple Cancer Types. *Front Mol Biosci.* 2022 Mar 17;9:743515.
165. Trebo A., Ditsch N., Degenhardt T., Kuhn C., Rahmeh M., Schmoeckel E., Mayr D., Czogalla B., Kolben T., Meister S., Mahner S., Jeschke U., Hester A., First Evidence for a Role of Siglec-8 in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 18;22(4):2000.
166. Barkal A.A., Brewer R.E., Markovic M., Kowarsky M., Barkal S.A., Zaro B.W., Krishnan V., Hatakeyama J., Dorigo O., Barkal L.J., Weissman I.L., CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature.* 2019 Aug;572(7769):392-396.
167. Takamiya R., Ohtsubo K., Takamatsu S., Taniguchi N., Angata T., The interaction between Siglec-15 and tumor-associated sialyl-Tn antigen enhances TGF- β secretion from monocytes/macrophages through the DAP12-Syk pathway. *Glycobiology.* 2013 Feb;23(2):178-87.
168. Spence S., Greene M.K., Fay F., Hams E., Saunders S.P., Hamid U., Fitzgerald M., Beck J., Bains B.K., Smyth P., Themistou E., Small D.M., Schmid D., O'Kane C.M., Fitzgerald D.C., Abdelghany S.M., Johnston J.A., Fallon P.G., Burrows J.F., McAuley D.F., Kissenpfennig A., Scott C.J., Targeting Siglecs with a sialic acid-decorated nanoparticle abrogates inflammation. *Sci Transl Med.* 2015 Sep 2;7(303):303ra140.
169. Agrawal V., Pourhassan H., Tsai N.C., Ngo D., Koller P., Malki M.M.A., Salhotra A., Ali H., Aribi A., Sandhu K.S., Arslan S., Ball B., Otoukesh S., Amanam I., Artz A., Singh D., Becker P.S., Stewart F.M., Smith E.P., Curtin P., Stein A.S., Marcucci G., Forman S.J., Nakamura R., Pullarkat V., Aldoss I., Post-Transplantation Sinusoidal Obstruction Syndrome in Adult Patients with B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Treated with Pretransplantation Inotuzumab. *Transplant Cell Ther.* 2023 Jan 19:S2666-6367(23)00038-6.
170. Janus A., Robak T., Hairy Cell Leukemia. In: Li W, editor. *Leukemia* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 Oct 16. Chapter 3.
171. Montesinos P., Kota V., Brandwein J., Bousset P., Benner R.J., Vandendries E., Chen Y., McMullin M.F., A phase IV study evaluating QT interval, pharmacokinetics, and safety

-
- following fractionated dosing of gemtuzumab ozogamicin in patients with relapsed/refractory CD33-positive acute myeloid leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2023 Mar 9;1–6.
172. Avril T., Freeman S.D., Attrill H., Clarke R.G., Crocker P.R., Siglec-5 (CD170) can mediate inhibitory signaling in the absence of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif phosphorylation. *J Biol Chem.* 2005 May 20;280(20):19843-51.
173. Vuchkovska A., Glanville D.G., Scurti G.M., Nishimura M.I., White P., Ulijasz A.T., Iwashima M., Siglec-5 is an inhibitory immune checkpoint molecule for human T cells. *Immunology.* 2022 Jun;166(2):238-248.
174. Lanier L.L., Bakker A.B., The ITAM-bearing transmembrane adaptor DAP12 in lymphoid and myeloid cell function. *Immunol Today.* 2000 Dec;21(12):611-4.
175. Yamanaka M., Kato Y., Angata T., Narimatsu H., Deletion polymorphism of SIGLEC14 and its functional implications. *Glycobiology.* 2009 Aug;19(8):841-6.
176. Angata T., Ishii T., Motegi T., Oka R., Taylor R.E., Soto P.C., Chang Y.C., Secundino I., Gao C.X., Ohtsubo K., Kitazume S., Nizet V., Varki A., Gemma A., Kida K., Taniguchi N., Loss of Siglec-14 reduces the risk of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Sep;70(17):3199-210.
177. Angata T., Hayakawa T., Yamanaka M., Varki A., Nakamura M., Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. *FASEB J.* 2006 Oct;20(12):1964-73.
178. Pepin M., Mezouar S., Pegon J., Muczynski V., Adam F., Bianchini E.P., Bazaa A., Proulle V., Rupin A., Paysant J., Panicot-Dubois L., Christophe O.D., Dubois C., Lenting P.J., Denis C.V., Soluble Siglec-5 associates to PSGL-1 and displays anti-inflammatory activity. *Sci Rep.* 2016 Nov 28;6:37953.
179. Comşa Ş., Cîmpean A.M., Raica M., The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res.* 2015 Jun;35(6):3147-54.
180. Huang Z., Yu P., Tang J., Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model. *Onco Targets Ther.* 2020 Jun 11;13:5395-5405.
181. Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J., THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* 2014 Nov;23(1):37-45.
182. Aleskandarany M.A., Vandenberghe M.E., Marchiò C., Ellis I.O., Sapino A., Rakha E.A., Tumour Heterogeneity of Breast Cancer: From Morphology to Personalised Medicine. *Pathobiology.* 2018;85(1-2):23-34.

-
183. Hankinson S.E., Polyak K., Garber J.E., Breast cancer. Multiple, often complex, risk factors. In World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention; Wild C.P., Weiderpass E., Stewart B.W., International Agency for Research on Cancer, France, Lyon, 2020, 382-393.
184. Ferreira M.A., Gamazon, E.R., Al-Ejeh F., Aittomäki K., Genome-wide association and transcriptome studies identify target genes and risk loci for breast cancer. *Nat. Commun.* 2019, 10, 1741.
185. Giuliano A.E., Connolly J.L., Edge S.B., Mittendorf E.A., Rugo H.S, Solin L.J., Weaver D.L., Winchester D.J., Hortobagyi G.N., Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017 Jul 8;67(4):290-303.
186. Place A.E., Jin Huh S., Polyak K., The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res.* 2011, 13, 227.
187. Gong M., Liu X., Zhao X., Wang H., A pyroptosis-related gene signature predicting survival and tumor immune microenvironment in breast cancer and validation. *BMC Cancer.* 2022 Sep 22;22(1):1005.
188. Li J., Wu J, Han J., Analysis of Tumor Microenvironment Heterogeneity among Breast Cancer Subtypes to Identify Subtype-Specific Signatures. *Genes (Basel).* 2022 Dec 23;14(1):44.
189. Santa-Maria C.A., Nanda R., Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2018 Oct;16(10):1259-1268.
190. Johansson A., Dar H., van 't Veer L.J., Tobin N.P., Perez-Tenorio G., Nordenskjöld A., Johansson U., Hartman J., Skoog L., Yau C., Benz C.C., Esserman L.J., Stål O., Nordenskjöld B., Fornander T., Lindström L.S., Twenty-Year Benefit From Adjuvant Goserelin and Tamoxifen in Premenopausal Patients With Breast Cancer in a Controlled Randomized Clinical Trial. *J Clin Oncol.* 2022 Dec 10;40(35):4071-4082.
191. Darakhshan S., Ghanbari A., Gholami Rad F., Bidmeshki Pour A., Tamoxifen and tranilast show a synergistic effect against breast cancer in vitro. *Bratisl Lek Listy.* 2015;116(1):69-73. PMID: 25666966.
192. Rohlenova K., Sachaphibulkij K., Stursa J., Bezawork-Geleta A., Blecha J., Endaya B., Werner L., Cerny J., Zobalova R., Goodwin J., Spacek T., Alizadeh Pesdar E., Yan B., Nguyen M.N., Vondrusova M., Sobol M., Jezek P., Hozak P., Truksa J., Rohlena J., Dong L.F., Neuzil J., Selective Disruption of Respiratory Supercomplexes as a New Strategy to Suppress Her2high Breast Cancer. *Antioxid Redox Signal.* 2017 Jan 10;26(2):84-103.

-
193. White-Gilbertson S., Lu P., Jones C.M., Chiodini S., Hurley D., Das A., Delaney J.R., Norris J.S., Voelkel-Johnson C., Tamoxifen is a candidate first-in-class inhibitor of acid ceramidase that reduces amitotic division in polyploid giant cancer cells-Unrecognized players in tumorigenesis. *Cancer Med.* 2020 May;9(9):3142-3152.Epub 2020 Mar 5. PMID: 32135040; PMCID: PMC7196070.
194. Lien E.A., Solheim E., Ueland P.M., Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. *Cancer Res.* 1991 Sep 15;51(18):4837-44.
195. Otto A.M., Paddenberg R., Schubert S., Mannherz H.G., Cell-cycle arrest, micronucleus formation, and cell death in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells by tamoxifen and cisplatin. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122(10):603-12.
196. Ocegüera-Basurto P., Topete A., Ocegüera-Villanueva A., Rivas-Carrillo J., Paz-Davalos M., Quintero-Ramos A., Del Toro-Arreola A., Daneri-Navarro A., Selective estrogen receptor modulators in the prevention of breast cancer in premenopausal women: a review. *Transl Cancer Res.* 2020 Jul;9(7):4444-4456.
197. Behjati S., Frank MH., The effects of tamoxifen on immunity. *Curr Med Chem.* 2009;16(24):3076-80.
198. Richards D.M., Hettinger J., Feuerer M., Monocytes and macrophages in cancer: development and functions. *Cancer Microenviron.* 2013 Aug;6(2):179-91.
199. Yao Y., Xu X.H., Jin L., Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol.* 2019 Apr 15;10:792.
200. Kadomoto S., Izumi K., Mizokami A., Macrophage Polarity and Disease Control. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 23;23(1):144.
201. Wu M.F., Lin C.A., Yuan T.H., Yeh H.Y., Su S.F., Guo C.L., Chang G.C., Li K.C., Ho C.C., Chen H.W., The M1/M2 spectrum and plasticity of malignant pleural effusion-macrophage in advanced lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2021 May;70(5):1435-1450.
202. Mantovani A., Allavena P., Marchesi F., Garlanda C., Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2022 Nov;21(11):799-820.
203. Chistiakov D.A., Killingsworth M.C, Myasoedova V.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V., CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest.* 2017 Jan;97(1):4-13.
204. Chen Y., Song Y., Du W., Gong L., Chang H., Zou Z., Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci.* 2019 Oct 20;26(1):78.

-
205. Mahmoud S.M., Lee A.H., Paish E.C., Macmillan R.D., Ellis I.O., Green A.R., Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2012 Feb;65(2):159-63.
206. Yang Z., Ming X.F., Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Front Immunol.* 2014 Oct 27;5:533.
207. Pesce J.T., Ramalingam T.R., Mentink-Kane M.M., Wilson M.S., El Kasmi K.C., Smith A.M., Thompson R.W., Cheever A.W., Murray P.J., Wynn T.A., Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog.* 2009 Apr;5(4):e1000371.
208. Aratake T., Higashi Y., Ueba Y., Hamada T., Shimizu T., Shimizu S., Yawata T., Ueba T., Saito M., The inhibitory role of intracellular free zinc in the regulation of Arg-1 expression in interleukin-4-induced activation of M2 microglia. *Metallomics.* 2018 Oct 17;10(10):1501-1509.
209. Rath M., Müller I., Kropf P., Closs E.I., Munder M., Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol.* 2014 Oct 27;5:532.
210. Ming X.F., Rajapakse A.G., Yepuri G., Xiong Y., Carvas J.M., Ruffieux J., Scerri I., Wu Z., Popp K., Li J., Sartori C., Scherrer U., Kwak B.R., Montani J.P., Yang Z., Arginase II Promotes Macrophage Inflammatory Responses Through Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Contributing to Insulin Resistance and Atherogenesis. *J Am Heart Assoc.* 2012 Aug;1(4):e000992.
211. Teodorczyk-Injeyan J., Cembrzynska-Nowak M., Lalani S., Kellen J.A., Modulation of biological responses of normal human mononuclear cells by antiestrogens. *Anticancer Res.* 1993 Jan-Feb;13(1):279-83.
212. Pepe G., Sfogliarini C., Rizzello L., Battaglia G., Pinna C., Rovati G., Ciana P., Brunialti E., Mornata F., Maggi A., Locati M., Vegeto E., ER α -independent NRF2-mediated immunoregulatory activity of tamoxifen. *Biomed Pharmacother.* 2021 Dec;144:112274.
213. Man S.M., Karki R., Kanneganti T.D., Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev.* 2017 May;277(1):61-75.
214. Evavold C.L., Ruan J., Tan Y., Xia S., Wu H., Kagan J.C., The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity.* 2018 Jan 16;48(1):35-44.e6.

-
215. Habanjar O., Bingula R., Decombat C., Diab-Assaf M., Caldefie-Chezet F., Delort L.. Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 16;24(4):4002.
216. Liu X., Yin S., Chen Y., Wu Y., Zheng W., Dong H., Bai Y., Qin Y., Li J., Feng S., Feng S., LPS induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF κ B, STAT3 or AP 1 activation. 2018. *Mol Med Rep* 17: 5484-5491.
217. Sfogliarini C., Pepe G., Dolce A., Della Torre S., Cesta M.C., Allegretti M., Locati M., Vegeto E.. Tamoxifen Twists Again: On and Off-Targets in Macrophages and Infections. *Front Pharmacol.* 2022 Mar 30;13:879020.
218. Feng R., Morine Y., Ikemoto T., Imura S., Iwahashi S., Saito Y., Shimada M., Nrf2 activation drive macrophages polarization and cancer cell epithelial-mesenchymal transition during interaction. *Cell Commun Signal.* 2018 Sep 4;16(1):54.
219. Ore A., Adeogun A.I., Akinloye O.A., Hydroethanolic Extract of Defatted *Buchholzia coriacea* Seeds Alleviates Tamoxifen-Induced Hepatic Triglyceride Accumulation, Inflammation and Oxidative Distress in Rat. *Medicines (Basel).* 2021 Dec 24;9(1):1.
220. Komi J., Möttönen M., Luukkainen R., Lassila O., Non-steroidal anti-oestrogens inhibit the differentiation of synovial macrophages into dendritic cells. *Rheumatology (Oxford).* 2001 Feb;40(2):185-91. Jiang M, Zhang L, Ma X, Hu W, Chen Y, Yu M, Wang Q, Li X, Yin Z, Zhu Y, Gao X, Hajjar DP, Duan Y, Han J. Tamoxifen inhibits macrophage FABP4 expression through the combined effects of the GR and PPAR γ pathways. *Biochem J.* 2013 Sep 15;454(3):467-77.
221. Jiang M., Zhang L., Ma X., Hu W., Chen Y., Yu M., Wang Q., Li X., Yin Z., Zhu Y., Gao X., Hajjar D.P., Duan Y., Han J., Tamoxifen inhibits macrophage FABP4 expression through the combined effects of the GR and PPAR γ pathways. *Biochem J.* 2013 Sep 15;454(3):467-77.
222. Perez G., Olivares I.M., Rodriguez M.G., Ceballos G.M., Garcia Sanchez J.R., Arginase activity in patients with breast cancer: an analysis of plasma, tumors, and its relationship with the presence of the estrogen receptor. *Onkologie.* 2012;35(10):570-4.
223. Soysal S.D., Tzankov A., Muenst S.E., Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology.* 2015 Sep;82(3-4):142-52.
- 224 . Ferrarelli L.K., Tamoxifen as an immunotherapy. *Sci Signal.* 2017 Feb 14;10(466):eaam9611.

-
225. Svoronos N., Perales-Puchalt A., Allegranza M.J., Rutkowski M.R., Payne K.K., Tesone A.J., Nguyen J.M., Curiel T.J., Cadungog M.G., Singhal S., Eruslanov E.B., Zhang P., Tchou J., Zhang R., Conejo-Garcia J.R., Tumor Cell-Independent Estrogen Signaling Drives Disease Progression through Mobilization of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Discov.* 2017 Jan;7(1):72-85.
226. Munir S., Lundsager M.T., Jørgensen M.A., Hansen M., Petersen T.H., Bonefeld C.M., Friese C., Met Ö., Straten P.T., Andersen M.H., Inflammation induced PD-L1-specific T cells. *Cell Stress.* 2019 Sep 13;3(10):319-327.
227. Wielgat P., Wawrusiewicz-Kurylonek N., Czarnomysy R., Rogowski K., Bielawski K., Car H., The Paired Siglecs in Brain Tumours Therapy: The Immunomodulatory Effect of Dexamethasone and Temozolomide in Human Glioma In Vitro Model. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 11;22(4):1791.
228. Wielgat P., Czarnomysy R., Trofimiuk E., Car H., The sialoglycan-Siglec-E checkpoint axis in dexamethasone-induced immune subversion in glioma-microglia transwell co-culture system. *Immunol Res.* 2019 Oct;67(4-5):348-357.
229. Wielgat P., Mroz R.M., Stasiak-Barmuta A., Szepiel P., Chyczewska E., Braszko J.J., Holownia A., Inhaled corticosteroids increase siglec-5/14 expression in sputum cells of COPD patients. *Adv Exp Med Biol.* 2015;839:1-5.
230. Hühn D., Martí-Rodrigo P., Mouron S., Hansel C., Tschapalda K., Porebski B., Häggblad M., Lidemalm L., Quintela-Fandino M., Carreras-Puigvert J., Fernandez-Capetillo O., Prolonged estrogen deprivation triggers a broad immunosuppressive phenotype in breast cancer cells. *Mol Oncol.* 2022 Jan;16(1):148-165.
231. Jiang K.Y., Qi L.L., Kang F.B., Wang L., The intriguing roles of Siglec family members in the tumor microenvironment. *Biomark Res.* 2022 Apr 13;10(1):22.
232. Stanczak M.A., Läubli H., Siglec receptors as new immune checkpoints in cancer. *Mol Aspects Med.* 2023 Apr;90:101112.
233. Lin C.H., Yeh Y.C., Yang K.D., Functions and therapeutic targets of Siglec-mediated infections, inflammations and cancers. *J Formos Med Assoc.* 2021 Jan;120(1 Pt 1):5-24.
234. Trebo A., Ditsch N., Degenhardt T., Kuhn C., Rahmeh M., Schmoeckel E., Mayr D., Czogalla B., Kolben T., Meister S., Mahner S., Jeschke U., Hester A., First Evidence for a Role of Siglec-8 in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 18;22(4):2000.
235. Metcalf K.J., Hayward M.K., Berens E., Ironside A.J., Stashko C., Hwang E.S., Weaver V.M., Immunosuppressive glycoproteins associate with breast tumor fibrosis and aggression. *Matrix Biol Plus.* 2022 Mar 9;14:100105.

-
236. Shafi S., Aung T.N., Xirou V., Gavrielatou N., Vathiotis I.A., Fernandez A., Moutafi M., Yaghoobi V., Herbst R.S., Liu L.N., Langermann S., Rimm D.L., Quantitative assessment of Siglec-15 expression in lung, breast, head, and neck squamous cell carcinoma and bladder cancer. *Lab Invest.* 2022 Oct;102(10):1143-1149.
237. Beatson R., Tajadura-Ortega V., Achkova D., Picco G., Tsourouktsoglou T.D., Klausing S., Hillier M., Maher J., Noll T., Crocker P.R., Taylor-Papadimitriou J., Burchell J.M., The mucin MUC1 modulates the tumor immunological microenvironment through engagement of the lectin Siglec-9. *Nat Immunol.* 2016 Nov;17(11):1273-1281.
238. Barkal A.A., Brewer R.E., Markovic M., Kowarsky M., Barkal S.A., Zaro B.W., Krishnan V., Hatakeyama J., Dorigo O., Barkal L.J., Weissman I.L., CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature.* 2019 Aug;572(7769):392-396.
239. Ali S.R., Fong J.J., Carlin A.F., Busch T.D., Linden R., Angata T., Areschoug T., Parast M., Varki N., Murray J., Nizet V., Varki A., Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B *Streptococcus*. *J Exp Med.* 2014 Jun 2;211(6):1231-42.
240. Liu Y.C., Yu M.M., Chai Y.F., Shou S.T., Sialic Acids in the Immune Response during Sepsis. *Front Immunol.* 2017 Nov 21;8:1601.
241. Thornhill S.I., Mak A., Lee B., Lee H.Y., Poidinger M., Connolly J.E., Fairhurst A.M., Monocyte Siglec-14 expression is upregulated in patients with systemic lupus erythematosus and correlates with lupus disease activity. *Rheumatology (Oxford).* 2017 Jun 1;56(6):1025-1030.
242. Wielgat P., Mroz R.M., Stasiak-Barmuta A., Szepiel P., Chyczewska E., Braszko J.J., Holownia A., Inhaled corticosteroids increase siglec-5/14 expression in sputum cells of COPD patients. *Adv Exp Med Biol.* 2015;839:1-5.
243. Haas Q., Boligan K.F., Jandus C., Schneider C., Simillion C., Stanczak M.A., Haubitz M., Seyed Jafari S.M., Zippelius A., Baerlocher G.M., Läubli H., Hunger R.E., Romero P., Simon H.U., von Gunten S., Siglec-9 Regulates an Effector Memory CD8⁺ T-cell Subset That Congregates in the Melanoma Tumor Microenvironment. *Cancer Immunol Res.* 2019 May;7(5):707-718.
244. Wu Y., Huang W., Xie Y., Wang C., Luo N., Chen Y., Wang L., Cheng Z., Gao Z., Liu S., Siglec-9, a Putative Immune Checkpoint Marker for Cancer Progression Across Multiple Cancer Types. *Front Mol Biosci.* 2022 Mar 17;9:743515.

-
245. Fraschilla I., Pillai S., Viewing Siglecs through the lens of tumor immunology. *Immunol Rev.* 2017 Mar;276(1):178-191.
246. Adams O.J., Stanczak M.A., von Gunten S., Läubli H., Targeting sialic acid-Siglec interactions to reverse immune suppression in cancer. *Glycobiology.* 2018 Sep 1;28(9):640-647.
247. Crocker P.R., Paulson J.C., Varki A., Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2007 Apr;7(4):255-66.
248. Rodrigues E., Macauley M.S., Hypersialylation in Cancer: Modulation of Inflammation and Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel).* 2018 Jun 18;10(6):207.
249. Hyun S.W., Feng C., Liu A., Lillehoj E.P., Trotta R., Kingsbury T.J., Passaniti A., Lugkey K.N., Chauhan S., Cipollo J.F., Luzina I.G., Atamas S.P., Cross A.S., Goldblum S.E., Altered sialidase expression in human myeloid cells undergoing apoptosis and differentiation. *Sci Rep.* 2022 Aug 19;12(1):14173.
250. Flowers H.M., Sharon N., Glycosidases--properties and application to the study of complex carbohydrates and cell surfaces. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1979;48:29-95.
251. Lin C.H., Yeh Y.C., Yang K.D., Functions and therapeutic targets of Siglec-mediated infections, inflammations and cancers. *J Formos Med Assoc.* 2021 Jan;120(1 Pt 1):5-24.
252. Gunji M., Sawa C., Akiyama M., Mukai S., Takaki T., Kang D., Honda K., Gemcitabine alters sialic acid binding of the glycocalyx and induces inflammatory cytokine production in cultured endothelial cells. *Med Mol Morphol.* 2023 Jan 9:1–10.
253. Wielgat P., Holownia A., Braszko J.J., Lipopolysaccharide changes sialylation pattern in the mouse central nervous system. *J Physiol Pharmacol.* 2012 Oct;63(5):555-61.
254. Weber M., Modemann S., Schipper P., Trauer H., Franke H., Illes P., Geiger K.D., Hengstler J.G., Kleemann W.J., Increased polysialic acid neural cell adhesion molecule expression in human hippocampus of heroin addicts. *Neuroscience.* 2006;138(4):1215-23.
255. Angata K., Fukuda M., Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. *Biochimie.* 2003 Jan-Feb;85(1-2):195-206.
256. Läubli H., Kawanishi K., George Vazhappilly C., Matar R., Merheb M., Sarwar Siddiqui S., Tools to study and target the Siglec-sialic acid axis in cancer. *FEBS J.* 2021 Nov;288(21):6206-6225.
257. Zhang X., Dong W., Zhou H., Li H., Wang N., Miao X., Jia L., α -2,8-Sialyltransferase Is Involved in the Development of Multidrug Resistance via PI3K/Akt Pathway in Human Chronic Myeloid Leukemia. *IUBMB Life.* 2015 Feb;67(2):77-87.

-
258. Pietrobono S., Stecca B., Aberrant Sialylation in Cancer: Biomarker and Potential Target for Therapeutic Intervention? *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 22;13(9):2014.
259. Santegoets K.C.M., Gielen P.R., Büll C., Schulte B.M., Kers-Rebel E.D., Küsters B., Bossman S.A.J.F.H., Ter Laan M., Wesseling P., Adema G.J., Expression profiling of immune inhibitory Siglecs and their ligands in patients with glioma. *Cancer Immunol Immunother*. 2019 Jun;68(6):937-949.
260. Lim J., Sari-Ak D., Bagga T., Siglecs as Therapeutic Targets in Cancer. *Biology (Basel)*. 2021 Nov 13;10(11):1178.