

KACPER WASIELEWSKI

**Badanie wpływu wybranych polimorfizmów genu cytochromu
P450 na przebieg leczenia imatynibem guzów stromalnych
przewodu pokarmowego.**

GDAŃSK 2017

Praca została wykonana
w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: dr. hab. n. med. Bartosz Wasąg

*Dziękuję Panu Profesorowi Januszowi Limonowi,
za możliwość rozpoczęcia badań opisanych w niniejszej pracy.
Dziękuję również Panu Doktorowi Bartoszowi Wasągowi,
za opiekę promotorską i pomoc w opublikowaniu wyników.
Dziękuję wreszcie koleżankom i koledze z Katedry,
za niezwykłą atmosferę, sprzyjającą pracy naukowej.*

Spis treści

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
2. STRESZCZENIE.....	8
3. WSTĘP	16
3.1. CHOROBY NOWOTWOROWE.....	16
3.1.1. Dane populacyjne.....	16
3.1.2. Onkogeneza.....	17
3.1.3. Czynniki rakotwórcze	19
3.2. NOWOTWORY STROMALNE PRZEWODU POKARMOWEGO (GIST)	22
3.2.1. Definicja.....	22
3.2.2. Epidemiologia	22
3.2.3. Objawy i rokowanie	23
3.2.4. Histologia	24
3.2.5. Molekularne podłoże GIST	26
3.2.5.1. Mutacje pierwotne genu <i>KIT</i>	27
3.2.5.2. Mutacje pierwotne genu <i>PDGFRA</i>	29
3.2.6. Inne czynniki patogenezy.....	30
3.2.7. Diagnoza i leczenie	31
3.3. IMATYNIB	33
3.3.1. Wdrożenie leku	33
3.3.2. Mechanizm działania	35
3.3.3. Profil farmakokinetyczny.....	36
3.3.4. Metabolizm i wydalanie.....	37
3.3.5. Oporność na leczenie	38
3.4. ENZYMY ZWIĄZANE Z METABOLIZMEM I TRANSPORTEM IMATYNIBU.....	42
3.4.1. Wybrane polimorfizmy białek enzymatycznych metabolizujących imatynib	42
3.4.1.1. Polimorfizm <i>CYP3A4*1B</i>	43
3.4.1.2. Polimorfizm <i>CYP3A5*3C</i>	44
3.4.1.3. Polimorfizmy <i>CYP2: C9*2, C19*2, C19*3</i> oraz <i>D6*4</i>	44
3.4.2. Wybrane polimorfizmy transporterów białkowych	46
3.4.2.1. Polimorfizm <i>ABCB1 3435C>T</i>	47
3.4.2.2. Polimorfizm <i>ABCG2 421C>A</i>	49
3.4.2.3. Wybrane polimorfizmy genów <i>SLC22A4</i> oraz <i>SLC22A5</i>	49

4. CEL PRACY	52
5. MATERIAŁY I METODY.....	53
5.1. BADANA GRUPA	53
5.2. MATERIAŁ I ODCZYNNIKI.....	54
5.3. APARATURA	57
5.4. METODY	58
5.4.1. Izolacja DNA	58
5.4.2. Oznaczanie stężenia DNA.....	59
5.4.3. Amplifikacja wybranych fragmentów.....	59
5.4.4. Elektroforeza agarozowa.....	62
5.4.5. PCR-RFLP	63
5.4.6. Sekwencjonowanie DNA.....	66
5.4.7. Analiza statystyczna.....	69
6. WYNIKI	70
6.1.1 Rozkład genotypów	70
6.1.2 Znaczenie lokalizacji guza pierwotnego	71
6.2. WYNIKI ANALIZY STATYSTYCZNEJ.....	71
6.2.1. Wyniki analizy jednoczynnikowej	72
6.2.2. Wyniki analizy wieloczynnikowej	72
7. Dyskusja	75
8. WNIOSKI	85
9. Bibliografia.....	86
10. ZAŁĄCZNIK.....	105

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABC	– białka transportowe z rodziny <i>ATP-binding cassette</i>
CML	– przewlekła białaczka szpikowa (<i>chronic myeloid leukemia</i>)
CYP	– białka enzymatyczne należące do cytochromu P450
dNTPs	– dezoksyrybonukleotydy (adeninowy, guaninowy, cytozynowy i tyminowy)
EC	– domena zewnątrzkomórkowa (<i>extracellular domain</i>)
EDTA	– kwas etylenodiaminotetraoctowy (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
GIST	– guz podścieliska przewodu pokarmowego (<i>gastrointestinal stromal tumor</i>)
h	– godzina (<i>hour</i>)
HCV	– wirus zapalenia wątroby typu C (<i>hepatitis C virus</i>)
HPF	– pole widzenia w dużym powiększeniu mikroskopu (<i>high power field</i>)
ICC	– komórki Cajala (<i>interstitial cells of Cajal</i>)
JM	– domena podbłonowa (<i>juxtamembrane domain</i>)
KI	– insert kinazowy (<i>kinase insert</i>)
KIT	– błonowy receptor dla czynnika komórek macierzystych
MDR	– oporność wielolekowa (<i>multi-drug resistance</i>)
NBFs	– rejon wiązania nukleotydów (<i>nucleotide-binding folds</i>)
PCR	– łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGFRA	– błonowy receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu α (<i>platelet-derived growth factor receptor α</i>)
RBC	– roztwór do lizy erytrocytów
RFLP	– polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
SCF	– czynnik komórek macierzystych
SDS	– siarczan dodecyłu sodu (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SLC	– białka transportowe z rodziny <i>solute-carriers</i>
SNP	– polimorfizm pojedynczego nukleotydu (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
TBE	– bufor do elektroforezy z kwasem bornym (<i>TRIS-Borate-EDTA</i>)
TK1	– domena 1 kinazy tyrozynowej (<i>tyrosine kinase domain 1</i>)

- TK2** – domena 2 kinazy tyrozynowej (*tyrosine kinase domain 2*)
- TM** – domena transbłonowa (*transmembrane domain*)
- TRIS** – 2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol
- WT** – typ dziki (*wild type*)

2. STRESZCZENIE

Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia, nowotwory stanowią drugą przyczynę zgonów wywołanych przez choroby niezakaźne, ustępując jedynie chorobom układu sercowo-naczyniowego. Najczęściej nowotwory dotyczą dróg oddechowych, układu pokarmowego, wątroby oraz piersi i prostaty. W walce z nimi szczególnie istotna jest profilaktyka, pozwalająca na wczesne ich wykrycie, co znacznie zwiększa szanse na wyleczenie. Równie ważne jest opracowywanie nowych oraz udoskonalanie istniejących terapii przeciwnowotworowych, w tym terapii celowanych, które opierają się na wykorzystaniu substancji leczniczych oddziałujących bezpośrednio na komórki nowotworowe przy minimalizacji efektów ubocznych w zdrowych tkankach. Wymaga to szczegółowego poznania mechanizmów molekularnych związanych zarówno z inicjacją, jak i progresją nowotworu oraz z dystrybucją w organizmie potencjalnych leków.

Proces transformacji nowotworowej zaczyna się od uszkodzenia DNA prawidłowej komórki w wyniku mutacji. Zdecydowana większość tych zmian jest usuwana przez systemy naprawy DNA, jednak niektóre ulegają utrwaleniu i mogą prowadzić do powstania nowotworu. Dotyczy to głównie mutacji w genach odpowiadających za proliferację i różnicowanie komórek (protoonkogeny), hamowanie wzrostu i apoptozę komórek (geny supresorowe) lub stabilność genetyczną komórek (geny mutatorowe). Jednym z takich genów jest protoonkogen *KIT*, którego mutacje mogą prowadzić do powstania nowotworu podścieliskowego przewodu pokarmowego (*GIST*, *gastrointestinal stromal tumor*). *GIST* to najczęstsze nowotwory pochodzenia mezenchymalnego, występujące w układzie pokarmowym, głównie w żołądku lub jelicie cienkim. Częstość ich występowania w Polsce szacuje się na około 15 przypadków/milion osób/rok. Za powstawanie *GIST* oprócz mutacji w genie *KIT* odpowiadają zmiany genetyczne w genie *PDGFRA*. Zarówno *KIT*, jak i *PDGFRA* kodują transbłonowe receptory o aktywności kinazy tyrozynowej. Mutacje tych genów prowadzą do uniezależnienia aktywności receptora od liganda koniecznego do jego aktywacji w warunkach prawidłowych. Skutkuje to nieograniczoną proliferacją komórek i w efekcie powstaniem nowotworu. Główną metodę leczenia stanowi resekcja guza, a w przypadkach nieoperacyjnych/rozsianych stosuje się terapię z wykorzystaniem imatynibu. Jest to inhibitor kinazy tyrozynowej, zdolny do zablokowania fosforylacji substratu i tym samym niezależnej od liganda ścieżki sygnałowej. U większości pacjentów obserwuje się przynajmniej częściową odpowiedź

na leczenie, jednak nawet w grupie tych chorych dochodzi po pewnym czasie do progresji choroby. Jest to związane z wystąpieniem wtórnej oporności na leczenie. Za zjawisko to odpowiadają mutacje wtórne, warunkujące oporność na imatynib. Początkowo mutacje te obecne są w nielicznej frakcji komórek guza, po pojawieniu się presji wywołanej podaniem leku, liczba tych komórek wzrasta, prowadząc do progresji choroby. Mimo znajomości tego mechanizmu, wciąż nie wiadomo dlaczego w grupach pacjentów o zbliżonych parametrach klinicznych, występują znaczne różnice w czasie, jaki upływa od rozpoczęcia terapii do progresji choroby. Jednym z czynników mogących wyjaśnić ten fenomen są uwarunkowania genetyczne.

Metabolizm i transport imatynibu odbywa się przy udziale między innymi białek z rodziny cytochromu P450 oraz transporterów ABC (*ATP-binding cassette*) i SLC (*solute-carriers*). Charakteryzują się one wysokim polimorfizmem genetycznym, mającym konsekwencje funkcjonalne, a co za tym idzie – niejednokrotnie także kliniczne. Określone warianty polimorficzne mogą modyfikować efekty różnych terapii farmakologicznych poprzez wpływ na tempo metabolizmu leków, ich dystrybucję czy dostępność biologiczną w organizmie. Wyniki wcześniejszych badań wykazały związek pomiędzy określonymi wariantami polimorficznymi genów kodujących wymienione rodziny białek, a profilem farmakokinetycznym imatynibu lub efektem jego leczenia u chorych z przewlekłą białaczką szpikową. Istnieje zatem przypuszczenie, że podobny związek może występować w przypadku chorych z GIST. Parametry farmakokinetyczne i farmakodynamiczne imatynibu wiążą się ze skutecznością terapii, zaś ich modyfikacja lub zaburzenie może wynikać z uwarunkowań genetycznych. Oznaczałoby to konieczność uwzględnienia indywidualnego profilu genetycznego w planowaniu terapii. Dlatego celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu dziesięciu wybranych polimorfizmów cytochromu P450 oraz transporterów ABC i SLC, na efekt leczenia imatynibem w grupie chorych z GIST.

W badaniu wzięło udział 101 pacjentów leczonych w Centrach Onkologicznych w Gdańsku, Kielcach i Warszawie oraz w I Katedrze Chirurgii Ogólnej i Klinice Chirurgii Ogólnej, Onkologicznej i Gastroenterologicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Badania uzyskały zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, a udział w nich był dobrowolny. Kryterium włączenia do badania stanowiło rozpoczęcie terapii imatynibem w dawce 400 mg na dobę, u pacjenta z wykrytym i poddanym analizie molekularnej GIST. Z

uwagi na związek rodzaju mutacji w guzie pierwotnym z wynikiem leczenia, chorych podzielono na odpowiednie grupy. Tylko grupa pacjentów z guzami z mutacją w eksonie 11 genu *KIT* okazała się wystarczająco liczna (71 przypadków) do przeprowadzenia wiarygodnej analizy statystycznej. Badania molekularne wykonano w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Warianty genetyczne obecne u poszczególnych chorych determinowano przy użyciu technik PCR-RFLP oraz sekwencjonowania DNA. Analizę statystyczną wykonano przy zastosowaniu programu STATISTICA for Windows, wersja 10.

Niniejsze badania zakładały, że każdy rozpatrywany polimorfizm jest potencjalnym czynnikiem ryzyka, mogącym wpływać na różnice w wolnym od progresji czasie przeżycia, pomiędzy pacjentami z GIST. Oceniano zatem znaczenie statystyczne różnic w czasie, jaki upływał od rozpoczęcia terapii do progresji choroby, z uwzględnieniem obecności danego wariantu genetycznego. Analiza przeprowadzona dla pięciu z dziesięciu badanych polimorfizmów nie wykazała wpływu któregokolwiek z nich na wolny od progresji czas przeżycia pacjentów z GIST poddanych terapii imatynibem. W przypadku pięciu kolejnych polimorfizmów analiza nie była możliwa z uwagi na zbyt małą liczbę nosicieli rzadszych genotypów. Wobec takich wyników, zdecydowano się na przeprowadzenie analizy możliwego addytywnego wpływu obecności kilku potencjalnie niekorzystnych genotypów, na czas upływający od rozpoczęcia terapii do progresji choroby. Na podstawie przeglądu literatury wytypowano warianty genetyczne, które mogą potencjalnie obniżać efektywność leczenia imatynibem. Z analizy wyłączono polimorfizmy, których na podstawie danych literaturowych nie powiązano w istotny sposób z profilem farmakokinetycznym imatynibu lub skutecznością terapii. Ostatecznie analizę przeprowadzono dla pięciu polimorfizmów: genu *CYP3A4* kodującego enzym odpowiedzialny za metabolizm imatynibu oraz genów *ABCB1*, *ABCG2*, *SCL22A4* i *SLC22A5*, których produkty białkowe biorą udział w transporcie imatynibu. W oparciu o genotyp podzielono pacjentów na odpowiednie grupy. W pierwszej znaleźli się chorzy będący nosicielami dwóch lub mniej, potencjalnie niekorzystnych genotypów. Drugą grupę utworzyli pacjenci, u których wykryto co najmniej trzy takie genotypy. Wynik testu log-rank ($p=0,057$), porównującego krzywe przeżycia nosicieli dwóch lub mniej potencjalnie niekorzystnych genotypów z nosicielami co najmniej trzech takich genotypów, wskazuje na możliwy wpływ obecności przynajmniej trzech niekorzystnych wariantów na skrócenie wolnego od progresji czasu przeżycia chorych z GIST.

Wyniki przeprowadzonych badań wykluczyły samodzielny wpływ któregośkolwiek wariantu polimorficznego na skuteczność terapii, wyrażoną czasem upływającym od rozpoczęcia terapii do progresji choroby. Należy jednak zwrócić uwagę na kilka aspektów. Po pierwsze wyniki byłyby bardziej przekonujące, gdyby oceniano wpływ badanych polimorfizmów na poziom leku w osoczu chorych. Niestety takich pomiarów nie wykonywano u pacjentów poddanych terapii. Po drugie badana grupa chorych, choć dość liczna w porównaniu z wieloma podobnymi, opublikowanymi badaniami wśród pacjentów z GIST, to w ujęciu statystycznym była jednak niewielka. Po trzecie w przypadku genów, których produkty odpowiadają za metabolizm imatynibu, trudno mówić o jakichkolwiek rozstrzygnięciach. Produkty genów z rodziny *CYP2* nie są znacząco zaangażowane w biotransformację leku, dlatego brak ich znaczenia nie jest aż tak zaskakujący. Możliwe, że ewentualne znaczenie wariantów tych genów ujawniłoby się jedynie w sytuacjach nadzwyczajnych, a więc w znacznie liczniejszych grupach. Natomiast w przypadku polimorfizmów z rodziny *CYP3*, której produkty odgrywają kluczową rolę w metabolizmie imatynibu, rzadsze allele okazały się na tyle nieliczne, że żadna wiarygodna analiza nie była możliwa. Podobny problem dotyczył jednego z transporterów (*ABCG2*). Bardziej zaskakujący jest brak znaczenia statystycznego dla przebiegu terapii, polimorfizmów w obrębie pozostałych transporterów: *ABCB1*, *SLC22A4* oraz *SLC22A5*. W literaturze opisano dość wyraźne różnice między poszczególnymi genotypami w obrębie tych genów. Możliwe jednak, że w niniejszej pracy niska liczebność grupy okazała się czynnikiem uniemożliwiającym identyfikację ewentualnej zależności. Uwagę zwraca jednak wynik analizy addytywnego wpływu potencjalnie istotnych polimorfizmów, na czas upływający od rozpoczęcia terapii do progresji choroby. Choć grupa pacjentów z potencjalnie niekorzystnym układem wariantów jest nieliczna (pięć przypadków), a wynik znajduje się na granicy istotności statystycznej ($p=0,057$), to jednak pozostaje on zgodny z założonym przypuszczeniem, że negatywny wpływ badanych polimorfizmów na efekt leczenia może się kumulować. W związku z niewielką liczebnością grupy nie można jednak wykluczyć przypadkowej zbieżności wyniku z założoną tezą. Wskazane wydaje się zatem przebadanie pod tym kątem większej liczby pacjentów. Jednoznaczne potwierdzenie wyniku otrzymanego w niniejszej pracy, stanowiłoby poważną przesłankę do poszerzenia diagnostyki molekularnej wśród chorych z GIST, leczonych z wykorzystaniem imatynibu, o analizę wariantów polimorficznych genów kodujących produkty białkowe odpowiedzialne za metabolizm i transport leku.

ABSTRACT

According to the World Health Organization's report, cancers are among the most frequently occurring non-infectious diseases, second only to cardiovascular diseases. The most common cancers affect lungs, gastrointestinal tract, liver, breast and prostate, respectively. Prevention seems to be the best approach in fighting tumours, however inventing new treatment methods and improving the existing ones are also important. In recent years, targeted therapies have become especially effective, being more tumour-specific than others. To apply them efficiently, it is crucial to understand the molecular basis of oncogenesis, but also mechanisms responsible for distribution and metabolism of potential drugs.

The oncogenesis is initiated by DNA damage caused by mutation. Majority of alterations are removed by the DNA repair system. However, some genetic variants are preserved and can initiate an oncogenesis if located within proto-oncogenes, suppressor genes or mutator genes. These genes control cell proliferation and differentiation, apoptotic processes and genome stability, respectively. A good example of these genes is *KIT*. Its mutations may lead to gastrointestinal stromal tumour (GIST). Neoplasms of this type are the most frequent mesenchymal tumours of gastrointestinal tract, predominantly located in stomach or small intestine. Their estimated frequency in Poland is 15 cases per million persons per year. Most of GISTs are caused by mutations in *KIT* or *PDGFRA* genes which encode for transmembrane receptors of tyrosine-kinase activity. These receptors play an important role in cell differentiation and proliferation. Mutations affecting these genes promote ligand independent autophosphorylation. This results in constantly active signal transduction leading to unlimited cell proliferation and consequently, tumour formation. The most effective treatment method is tumour resection, but in cases of inoperable and/or metastatic GIST, imatinib therapy is administered. This tyrosine-kinase inhibitor competitively blocks substrate phosphorylation and by that, also ligand independent signal transduction. In more than half of the cases, at least partial response is observed. However, most of patients finally develop secondary resistance to imatinib. This resistance is caused by secondary mutations which are initially present in a small fraction of tumour cells, but the stress caused by the drug make this fraction dominant in the tumour, which leads to progression. Even though the resistance mechanism is known, it is still uncertain why the time between imatinib intro-

duction and disease progression differs greatly among clinically similar cases. One of the factors which contribute to this phenomenon may be individual genetic profile.

Proteins from cytochrome P450 and from ABC and SLC transporters families are engaged in imatinib metabolism and transport. They are highly polymorphic which can affect their function and may have clinical consequences. Certain genetic variants may affect pharmacologic therapies by modulating the metabolism, distribution and/or bioavailability of the drug. It has been already described that polymorphic variants of genes encoding proteins belonging to the above mentioned families may affect pharmacokinetics of imatinib or can have an impact on the result of the therapy in patients with chronic myeloid leukaemia. Hence, it may be assumed that similar relationship could be observed in a group of imatinib-treated GIST patients. Therefore, genetic profile of the patients should be taken into consideration while planning individual therapies. The aim of this study was to investigate the influence of ten cytochrome P450 and ABC/SLC transporters polymorphisms on the effect of imatinib therapy in GIST patients.

The study enrolled 101 patients treated in Cancer Centres from Gdańsk, Kielce and Warsaw and in the First Department of General Surgery and Clinic of General, Oncological and Gastroenterological Surgery, Jagiellonian University in Kraków. The study was approved by the Independent Bioethics Commission for Research of the Medical University of Gdańsk. The inclusion criteria was the introduction of imatinib therapy (dose of 400 mg per day) in patients with GIST with known *KIT/PDGFR* mutation status. Due to known connection between mutation type of the tumour and therapy efficacy, patients were divided into subgroups according to the mutation type in the primary tumour. Only the group of patients with tumours harbouring mutation in exon 11 of *KIT* gene, proved to be large enough (71 cases) to perform statistical analysis. The research was conducted at the Department of Biology and Medical Genetics of the Medical University of Gdańsk. Polymorphic variants were determined by PCR-RFLP and DNA sequencing methods. Statistical analysis was performed using STATISTICA for Windows, version 10 software.

The main assumption of the study was that each of the chosen polymorphisms was a potential risk factor affecting the time difference between the initiation of imatinib therapy and disease progression among GIST patients. Therefore, the statistical significance of time differences in time to progression value among specific variant carriers was evaluated. The results of the analysis performed in five of ten chosen poly-

morphisms showed no important differences in time to progression between specific variant carriers. In case of five other polymorphisms the analysis was not performed due to insufficient minor allele frequency. Due to such results it was decided that the cumulative effect on the therapy of potentially unfavourable genotypes should be assessed. Based on literature, five genetic variants related to the decreased therapy efficacy were designated. They concerned genes: *CYP3A4* encoding main imatinib metabolizer and *ABCB1*, *ABCG2*, *SCL22A4* and *SLC22A5* encoding transporter proteins. Based on the previously determined polymorphic variants, patients were divided into two groups. The first consist of carriers of two or less potentially unfavourable genotypes. The other, carriers of at least three such genotypes. Survival curves of both groups were compared with log-rank test giving p value of 0.057. This indicates possible negative effect of the presence of at least three unfavourable genotypes on time to progression value.

The results of this study showed that none of the chosen polymorphisms alone affected the imatinib therapy in GIST patients. However, a few issues should be mentioned. Firstly, the results concerned time to progression differences. They would be more convincing if they concerned plasma levels of imatinib. Unfortunately, such data was not available. Secondly, although the studied population was relatively large in comparison to similar studies, it still was not large enough to provide satisfying statistical analysis. Thirdly, in case of genes encoding for proteins that conduct imatinib metabolism, any final conclusion cannot be provided. Gene products from *CYP2* family play only a minor role in imatinib metabolism. Therefore, the results concerning them are not surprising. Perhaps, their potential importance would manifest in specific clinical conditions and that would require a study on a significantly larger population. Whereas, the polymorphisms of *CYP3* family products which are essential in imatinib metabolism, could not have been analysed, due to insufficient minor allele frequencies. A similar problem concerned *ABCG2* polymorphism. The more surprising results concern polymorphic variants of *ABCB1*, *SLC22A4* and *SLC22A5* genes. All three have been previously shown to be of importance in imatinib therapies. It is possible that a limited population of this study prevented the manifestation of their effect on the time to progression. However, it is worth emphasising the results of cumulative effect analysis. Although, the group of potentially unfavourable genotype pattern carriers is relatively small (five cases) and the result is of borderline significance ($p=0.057$), it is consistent with the initial assumption that negative effect of the studied variants may be cumula-

tive. It should be stated though, that due to a limited population, this result may be coincidental. Therefore, similar study on a larger population is advised. A confirmation of the results presented in this study would justify the consideration of incorporating a molecular assessment of specific genetic variants pattern to individualized imatinib therapy in GIST patients.

3. WSTĘP

3.1. CHOROBY NOWOTWOROWE

3.1.1. Dane populacyjne

Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*), w 2012 roku na świecie zanotowano około 38 milionów zgonów, których przyczyną były choroby niezakaźne. W tej grupie najliczniejsze okazały się choroby układu sercowo-naczyniowego (46,2%; 17,5 miliona), a na drugim miejscu znalazły się nowotwory (21,7%; 8,2 miliona). W 2015 roku na świecie liczba nowych zachorowań na złośliwe nowotwory wyniosła 17,5 miliona, a w latach 2005-2015 odnotowano 33% wzrost liczby zachorowań. W 2012 roku w Polsce choroby nowotworowe były odpowiedzialne za ponad 30% wszystkich zgonów wywołanych przez choroby niezakaźne [46, 174]. Najczęstszymi i zarazem odpowiedzialnymi za największą liczbę zgonów nowotworami na świecie są przede wszystkim nowotwory: dróg oddechowych (głównie płuc), jelita grubego, żołądka, wątroby, piersi i prostaty [173]. Bardziej szczegółowe dane dotyczące częstości występowania poszczególnych nowotworów w Europie i na świecie podano w tabelach 1 i 2.

Tabela 1. *Table 1.* Najczęściej występujące złośliwe nowotwory u mężczyzn na świecie i w Europie. *Frequency of the most common cancers in men, in Europe and in the World* [173].

Kolejność według częstości występowania <i>Order according to frequency</i>	Lokalizacja (Świat) <i>Location (World)</i>	Lokalizacja (Europa) <i>Location (Europe)</i>
1	Tchawica, oskrzela, płuca <i>Trachea, bronchus, lung</i>	Tchawica, oskrzela, płuca <i>Trachea, bronchus, lung</i>
2	Żołądek <i>Stomach</i>	Żołądek <i>Stomach</i>
3	Wątroba <i>Liver</i>	Jelito grube i odbytnica <i>Colon and rectum</i>
4	Jelito grube i odbytnica <i>Colon and rectum</i>	Prostata <i>Prostate</i>

Tabela 2. *Table 2. Najczęściej występujące nowotwory u kobiet na świecie i Europie. Frequency of the most common cancers in women, in Europe and in the World [173].*

Kolejność według częstości występowania <i>Order according to frequency</i>	Lokalizacja (Świat) <i>Location (World)</i>	Lokalizacja (Europa) <i>Location (Europe)</i>
1	Piersi <i>Breast</i>	Piersi <i>Breast</i>
2	Tchawica, oskrzela, płuca <i>Trachea, bronchus, lung</i>	Jelito grube i odbytnica <i>Colon and rectum</i>
3	Żołądek <i>Stomach</i>	Żołądek <i>Stomach</i>
4	Jelito grube i odbytnica <i>Colon and rectum</i>	Tchawica, oskrzela, płuca <i>Trachea, bronchus, lung</i>

Szacuje się, że w Polsce z powodu chorób nowotworowych zmarło w 2010 roku ponad 92.000 osób i zgłoszono ponad 140.000 nowych przypadków nowotworów złośliwych. Ponadto, 320.000 osób żyło z nowotworem zdiagnozowanym w ciągu poprzedzającego pięcioletnia [159].

Dlatego też, niezwykle istotna wydaje się profilaktyka, mająca na celu wczesne wykrywanie, a przez to bardziej skuteczne zwalczanie nowotworów. Ważne jest również opracowywanie nowych oraz udoskonalanie istniejących terapii, spośród których szczególnego znaczenia nabierają terapie celowane. Część z nich opiera się na zastosowaniu substancji leczniczych, które oddziałują bezpośrednio na komórki nowotworowe co minimalizuje efekty uboczne w zdrowych tkankach. To podejście terapeutyczne wymaga jednak szczegółowego poznania mechanizmów molekularnych, związanych zarówno z inicjacją i progresją nowotworu, jak i z dystrybucją w organizmie potencjalnych leków.

3.1.2. Onkogeneza

Proces transformacji nowotworowej, czyli przekształcenia się zdrowej komórki w nowotworową, jest złożony i długotrwały. Jego początek zawsze wiąże się z uszkodzeniem DNA prawidłowej komórki. Defekt taki, czyli mutacja, nie musi jednak prowadzić do powstania nowotworu. Większość mutacji jest bowiem usuwana przez systemy naprawy DNA, a nawet jeżeli do takiej naprawy nie dojdzie, nie oznacza to, że mutacja objawi się fenotypowo. Niemniej jednak utrwalenie się mutacji może prowadzić do wielu poważnych nieprawidłowości, w tym także do powstania nowotworu, którego biolo-

gia, przebieg i podatność na leczenie mogą być bardzo różne [91]. Nie każda utrwalona mutacja jest zdolna do zainicjowania procesu nowotworzenia, którego etapy przedstawiono w tabeli 3. Potencjał kancerogeny mają tylko te mutacje, które nie mają charakteru letalnego i do których dochodzi w obrębie określonych genów. Geny te dzieli się na trzy grupy: protoonkogeny, geny supresorowe oraz geny mutatorowe [91].

Tabela 3. *Table 3. Etapy kancerogenezy. Stages of cancerogenesis.* Na podstawie; *on the basis of: Biologia molekularna w medycynie; red. J. Bal.*

ETAP <i>STAGE</i>	CHARAKTERYSTYKA <i>CHARACTERISTIC</i>	CZAS TRWANIA <i>DURATION</i>
PREINICJACJA <i>PREINITIATION</i>	ekspozycja na kancerogeny <i>exposure on carcinogens</i>	całe życie <i>lifetime</i>
INICJACJA <i>INITIATION</i>	nagromadzenie mutacji prowadzących do transformacji <i>accumulation of mutations leading to cancer transformation</i>	od kilku do kilkadziesiąt lat <i>several to tens of years</i>
PROMOCJA <i>PROMOTION</i>	selekcja klonalna <i>clonal selection</i> nabycie zdolności do migracji <i>migration ability acquisition</i>	kilka lat <i>several years</i>
PROGRESJA <i>PROGRESSION</i>	dalsza selekcja mutacji <i>further selection of mutations</i> nabycie zdolności do przerzutowania <i>metastatic ability acquisition</i>	od kilku miesięcy do kilku lat <i>several months to several years</i>

Protoonkogeny zaangażowane są w procesy proliferacji i różnicowania komórek. Istnieją trzy mechanizmy przekształcenia protoonkogenów w onkogeny na skutek mutacji: niewielkie mutacje zmieniające aktywność białka; amplifikacje prawidłowych genów, prowadzące do nadekspresji kodowanych białek oraz translokacje między chromosomami, polegające na przemieszczeniu się fragmentu jednego chromosomu i jego połączeniu z innym. W skutek tych ostatnich może dojść do przeniesienia całego protoonkogenu do obszaru, w którym DNA ulega wzmożonej ekspresji lub do przeniesienia jedynie fragmentu protoonkogenu i jego połączeniu z innym genem, co skutkuje powstaniem genu fuzyjnego, kodującego białko, którego aktywność jest przyczyną nadmiernej proliferacji. Przykładem aktywacji onkogenu może być protoonkogen *KIT*, którego mutacja powoduje powstawanie nieprawidłowego receptora błonowego. Zmutowany receptor, w przeciwieństwie do swojego prawidłowego odpowiednika, nie wymaga aktywacji ligandem, przez co nieustannie pobudza proliferację komórek i tym samym powstanie nowotworu. Onkogen ten jest wykrywany w przeważającej większości guzów podścieliska przewodu pokarmowego (*GIST, gastrointestinal stromal tu-*

mors). Mutacje protoonkogenów mają charakter dominujący, co oznacza, że objawia się fenotypowo nawet wtedy, gdy nieprawidłowość dotyczy tylko jednego allelu [91].

Geny supresorowe to antagoniści protoonkogenów biorący udział w procesach hamujących wzrost oraz indukujących naprawę DNA i apoptozę. Ich inaktywacja przez mutacje, zaburzenie transkrypcji lub utratę całych alleli, uniemożliwia m.in. włączenie ścieżki apoptotycznej w nieprawidłowych komórkach. Przykładem takiego genu jest *RBI*, którego produkt białkowy zapobiega nadmiernemu wzrostowi komórek. Brak jego funkcjonalnej formy jest przyczyną siatkówczaka złośliwego. Charakterystyczną cechą tych genów jest recesywny model ich działania. Oznacza to, że w przeciwieństwie do protoonkogenów, aby zaburzenie ujawniło się fenotypowo, utrata funkcji musi nastąpić w obu allelach [91].

Geny mutatorowe lub inaczej stabilizujące genom, odpowiadają za procesy naprawy DNA i prawidłową segregację chromosomów, czyli za stabilność genetyczną komórek. Jej zaburzenie jest charakterystyczne dla komórek nowotworowych i wiąże się z ułatwionym nabywaniem przez nie nowych mutacji. Ludzki genom jest nieustannie narażony na działanie zarówno wewnętrznych, i jak zewnętrznych czynników mutagennych, których negatywne efekty są niwelowane przez geny mutatorowe, zapewniające integralność genomu. Przykładowymi genami stabilizującymi są *MSH2*, *MLH1* oraz *MSH6*, których mutacje wykrywa się w niektórych dziedzicznych niepolipowatych rakach jelita grubego [91].

Źródłem nowotworów są zatem określone mutacje mogące mieć charakter germinalny lub somatyczny. Pierwsze z nich, to mutacje dziedziczne, obecne w każdej komórce organizmu. Dotyczy to zazwyczaj niewielkich mutacji u osób z rodzinną predyspozycją do wystąpienia nowotworu. Zdecydowana większość nowotworów wykształca się na skutek wystąpienia w trakcie życia mutacji somatycznej, czyli nowopowstałej mutacji pojedynczej komórki, nieobecnej poza tkanką nowotworową. Prawdopodobieństwo wystąpienia takiej mutacji wzrasta wraz ze zwiększającym się narażeniem organizmu na czynniki rakotwórcze [91].

3.1.3. Czynniki rakotwórcze

W każdym organizmie dochodzi do mutacji spontanicznych, wynikających z „błędów” w procesie replikacji. Są one jednak zazwyczaj usuwane przez wspomniany apa-

rat naprawczy, dlatego w procesie nowotworzenia większe znaczenie mają te mutacje, które są indukowane przez zewnętrzne czynniki rakotwórcze, czyli karcynogeny. Istnieje wiele takich czynników, a spośród nich najlepiej poznane są te, które na skutek swojej bezpośredniej zdolności do wywoływania mutacji, określa się mutagenami. Wśród nich można wyróżnić trzy zasadnicze grupy: fizyczne, biologiczne i chemiczne. Do mutagenów fizycznych zalicza się m.in. promieniowanie jonizujące. Mutageny biologiczne to głównie niektóre wirusy, zdolne do wprowadzania swoich genów do genomu komórki gospodarza i tym samym zmieniania jego sekwencji [91].

Najszerzą i zarazem odpowiedzialną za większość zachorowań na nowotwory złośliwe grupą są mutageny chemiczne, które mogą zaburzać sekwencję DNA w sposób bezpośredni (np. alkilacja, interkalacja) lub za pośrednictwem swoich metabolitów. W tym drugim przypadku mowa jest o prokancerogenach. Są to najszerzej rozpowszechnione z mutagenów chemicznych, a ich nazwa wynika z faktu, że w swojej naturalnej formie nie mają tak silnego potencjału mutagennego, jak po aktywacji metabolicznej, do której dochodzi w organizmie. Należą do nich między innymi policykliczne węglowodory aromatyczne, powstające w procesach spalania związków organicznych, np. paliw kopalnych czy roślin (w tym tytoniu), a także przy obróbce termicznej żywności. Zatem prokancerogeny obecne są w atmosferze, niektórych używkach czy w żywności, co oznacza, że jesteśmy nieustannie wyeksponowani na ich działanie. Dlatego niebagatelne znaczenie mają tryb życia i dieta, od których zależna jest wielkość dawek prokancerogenów, na które jesteśmy narażeni. Żeby usunąć je z ustroju, musi dojść w organizmie do ich przekształcenia w postać rozpuszczalną w wodzie. To właśnie aktywne metabolicznie produkty przejściowe tego procesu mają właściwości kancerogenne. Powstają one głównie w wątrobie przy udziale między innymi izoenzymów cytochromu P450, których zadaniem jest taka przemiana ksenobiotyków, czyli zewnętrznych związków obcych dla organizmu, by możliwe stało się ich wydalenie. Wydajność i przebieg tego procesu zależą między innymi od poprawnego funkcjonowania zaangażowanych w niego enzymów, których budowa i działanie mogą się różnić nawet między przedstawicielami tego samego rodzaju białka. Wynika to z faktu, iż enzymy te kodowane są przez geny występujące w różnych formach allelicznych, czyli alternatywnych wersjach sekwencji tego samego genu, określanych jako polimorfizmy. Taki stan rzeczy sprawia, że każdy organizm ma indywidualny, uwarunkowany genetycznie układ enzymatyczny, wpływający na skuteczność metabolizmu ksenobiotyków, do których należą także leki

przeciwnowotworowe. Oznacza to, że nie tylko charakter transformacji nowotworowej, ale także przebieg terapii, polegającej na zastosowaniu określonych substancji leczniczych, zależy od uwarunkowań genetycznych, których poznanie może pozwolić na dopasowanie leczenia do indywidualnych potrzeb pacjenta [91].

3.2. NOWOTWORY STROMALNE PRZEWODU POKARMOWEGO (GIST)

3.2.1. Definicja

Złośliwe nowotwory przewodu pokarmowego to jedne z najczęściej diagnozowanych chorób nowotworowych (tabele 1 i 2). Znaczną większość z nich stanowią raki, natomiast niewielka część to stosunkowo niedawno wyodrębniona grupa guzów określana jako: nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (GIST, *gastrointestinal stromal tumors*). W przeszłości większość z nich była klasyfikowana jako mięśniaki gładkokomórkowe, nerwiakowłókniaki czy nerwiaki osłonkowe, jednak bardziej szczegółowe badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej wykazały brak cech typowych dla komórek mięśniówki gładkiej [106, 166]. Podobne wyniki uzyskano poprzez analizę ultrastrukturalną i immunohistochemiczną, które wykluczyły ich potencjalne pochodzenie zarówno od komórek Schwanna, jak i mięśniówki gładkiej. W związku z tym autorzy użyli neutralnego i do dzisiaj stosowanego określenia „nowotwór stromalny przewodu pokarmowego” [102].

3.2.2. Epidemiologia

GIST to najczęstsze guzy pochodzenia mezenchymalnego, występujące w ścianie całego przewodu pokarmowego. Najczęściej GIST zlokalizowane są w żołądku (60-70%), jelicie cienkim (25-30%), dwunastnicy (5%), odbycie (5%), przełyku (1-3%) oraz jelicie grubym (1%) [105]. Do 10% wszystkich guzów może występować w innych przestrzeniach jamy brzusznej, najczęściej są to jednak przerzuty z przewodu pokarmowego [105, 107, 108, 133]. Częstość zachorowań waha się od około 7 do 20 przypadków na milion osób na rok (tabela 4). Szacuje się, że w Polsce dochodzi do około 600 zachorowań rocznie, z czego do 190 to GIST rozsiany [138]. Zdecydowana większość diagnozowanych przypadków występuje po 40. r.ż., a mediana przypada na 60. – 65. r.ż. [107]. U dzieci GIST są niezwykle rzadkie, stanowią poniżej 1% wszystkich przypadków i prawdopodobnie charakteryzują się odmienną niż u dorosłych patogenezą [106, 130].

Tabela 4. *Table 4.* Zapadalność na GIST w wybranych regionach świata. *Incidence of GIST in different regions of the world.*

KRAJ (region) COUNTRY (province)	Liczba zachorowań / milion mieszkańców / rok Number of events / million residents / year
Chiny (Szanghaj) [97] <i>China (Shanghai)</i>	21,1
Francja [110] <i>France</i>	8,5-10
Hiszpania (Girona) [137] <i>Spain (Girona)</i>	12,4
Holandia [52] <i>Netherlands</i>	12,7
Islandia [158] <i>Iceland</i>	11
Szwecja (zachodnia część) [117] <i>Sweden (western part)</i>	14,5
Tajwan [21] <i>Taiwan</i>	19,7
USA [157]	6,8
Włochy (Modena) [111] <i>Italy (Modena)</i>	14,2

3.2.3. Objawy i rokowanie

Najczęściej towarzyszące GIST objawy to przede wszystkim krwawienia z przewodu pokarmowego prowadzące do anemii oraz bóle podobne do tych, jakie zazwyczaj towarzyszą wrzodom. Guzy niewywołujące owrzodzeń mogą być wyczuwalne zewnętrznie, nie dając przy tym innych wyraźnych objawów. Ponad 30% guzów, w szczególności tych niewielkich, jest wykrywanych przypadkowo podczas badań radiologicznych lub endoskopowych oraz podczas zabiegów chirurgicznych związanych z innymi chorobami. Część guzów odbytu jest również przypadkowo diagnozowana podczas badań ginekologicznych lub prostaty [105, 107].

Rokowanie uzależnione jest głównie od wielkości guza oraz indeksu mitotycznego, określonego jako liczba podziałów komórkowych widocznych pod dużym powiększeniem mikroskopu, przypadających na określoną liczbę pól widzenia. Istotna jest również lokalizacja ogniska pierwotnego GIST. Zależności pomiędzy wymienionymi parametrami a stopniem agresywności przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. *Table 5. Zależności pomiędzy stopniem agresywności GIST a indeksem mitotycznym, wielkością i lokalizacją guza The relationship between malignant potential of GIST and size, mitotic rate and site of the tumor. Na podstawie; on the basis of: Poveda 2017 [129].*

Indeks mitotyczny <i>Mitotic rate</i>	Wielkość guza w cm <i>Tumor size in cm</i>	Stopień agresywności <i>Malignant potential</i>			
		Żołądek <i>Stomach</i>	Jelito cienkie <i>Small intestine</i>	Dwunastnica <i>Duodenum</i>	Odbyt <i>Rectum</i>
≤ 5/50 HPF	≤ 2	Brak <i>None</i>			
	> 2 ≤ 5	Bardzo niski <i>Very low</i>	Niski <i>Low</i>	Niski <i>Low</i>	Niski <i>Low</i>
	> 5 ≤ 10	Niski <i>Low</i>	Średni <i>Moderate</i>	Wysoki <i>High</i>	Wysoki <i>High</i>
	> 10	Średni <i>Moderate</i>	Wysoki <i>High</i>		
> 5/50 HPF	≤ 2	Brak <i>None</i>	Wysoki <i>High</i>	Wysoki <i>High</i>	Wysoki <i>High</i>
	> 2 ≤ 5	Średni <i>Moderate</i>			
	> 5 ≤ 10	Wysoki <i>High</i>			
	> 10	Wysoki <i>High</i>			

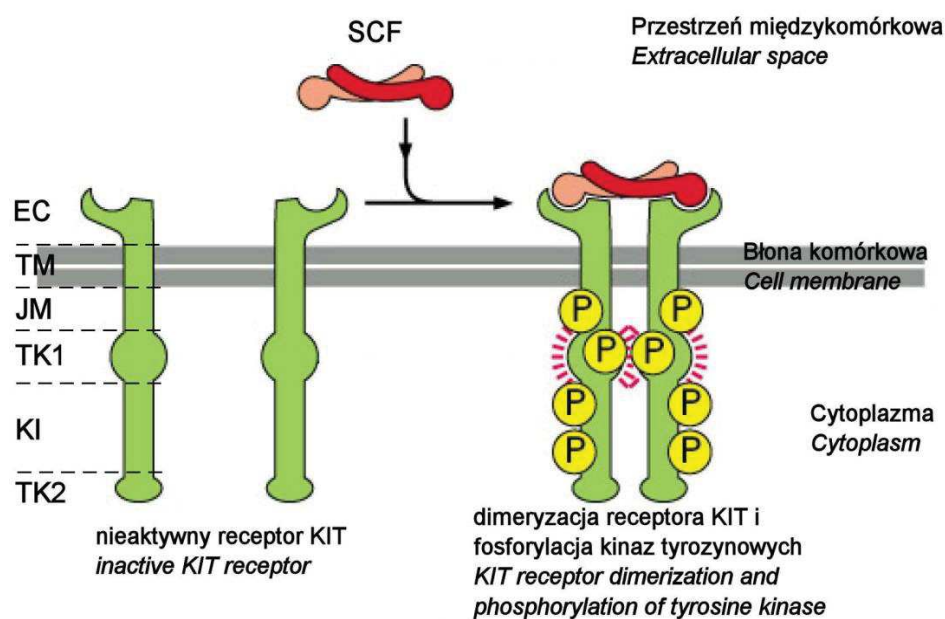
HPF – pole widzenia w dużym powiększeniu (400x); *high power field (400x)*

3.2.4. Histologia

GIST zbudowane są z komórek wrzecionowatych, epitelioidnych lub rzadziej pleomorficznych. Guzy składające się z komórek wrzecionowatych stanowią 60 – 70% GIST i charakteryzują się syncytialną budową, dużą gęstością jąder oraz nieznaczną ilością cytoplazmy. Częstą cechą guzów żołądka jest okołojądrowa wakuolizacja. Ponadto, niektóre małe guzy zbudowane są z komórek rozproszonych w wyraźnym, amorficznym podłożu kolagenowym. Około połowa guzów występujących między dwunastnicą a jelitem krętym charakteryzuje się występowaniem wyraźnych, okrągłych, owalnych lub wydłużonych złogów zewnątrzkomórkowych włókien kolagenu, co najczęściej wiąże się z lepszym rokowaniem. W pozostałych lokalizacjach guzy wrzecionowato-komórkowe stanowią zdecydowaną większość. Guzy zbudowane z komórek epitelioidnych stanowią 20 – 30% GIST. Granice komórkowe są wyraźne i w przypadku guzów żołądka, występujących zarówno w postaci łagodnej, jak i złośliwej, widać wieloboczne komórki z okrągłymi jądrami i obfitą cytoplazmą. Guzy zlokalizowane w jelicie cienkim okazują się niemal zawsze złośliwe i różnią się zarówno morfologicznie, jak i klinicznie od swoich odpowiedników z żołądka. W innych lokalizacjach występują rzadko, choć obserwowano guzy sieci czy odbytu. Guzy charakteryzujące się pleomorfizmem

nie przekraczają 5% GIST – większość guzów tego typu okazuje się mięśniakomięsakami gładkokomórkowymi lub mięsakami nieodróżnionymi [105].

GIST najprawdopodobniej wywodzą się z komórek Cajala (ICC, *interstitial cells of Cajal*) lub ich prekursorów i zlokalizowane są najczęściej śródściennie, podsurowiczo lub podśluzowo [77, 105, 106]. Komórki te, łącząc autonomiczny układ nerwowy z mięśniówką gładką przewodu pokarmowego, kontrolują tempo skurczów tej mięśniówki i w ten sposób pośrednio odpowiadają za perystaltykę układu pokarmowego [70, 99, 106]. Komórki Cajala charakteryzują się obecnością receptora KIT, którego aktywacja ligandem SCF (*stem cell factor*) prowadzi do wzrostu i stabilizacji populacji ICC [65, 156, 179]. Mechanizm działania receptora (ryc. 1) polega na przyłączeniu liganda do jego zewnątrzkomórkowej domeny co prowadzi do jego dimeryzacji. Efektem tego jest fosforylacja wewnątrzkomórkowej kinazy tyrozynowej, która uruchamia kaskadę sygnałową.



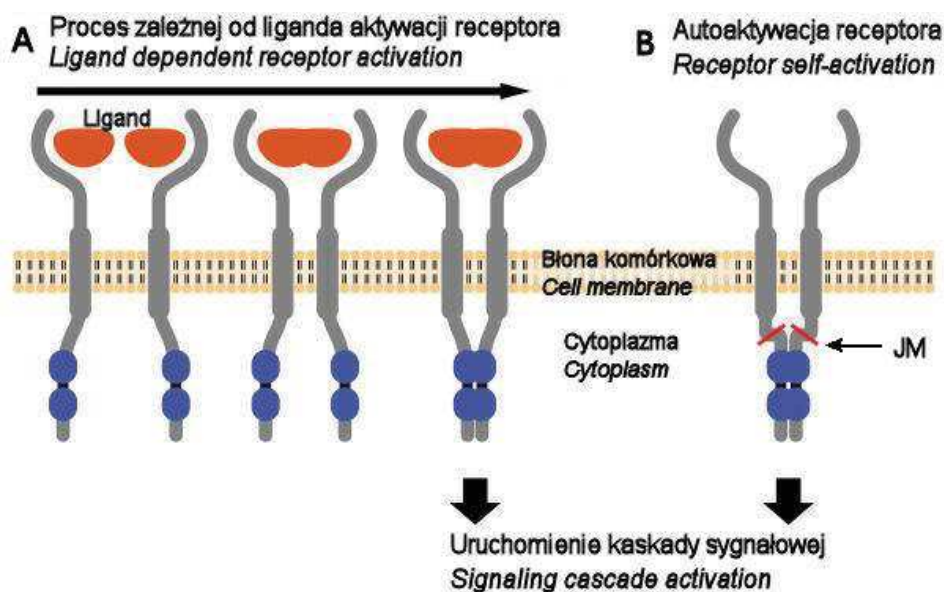
Ryc. 1. Fig. 1. Mechanizm działania receptora KIT. *KIT receptor activation mechanism*. SCF – czynnik komórek macierzystych; *stem cell factor*; EC – domena zewnątrzkomórkowa; *extracellular domain*; TM – domena transbłonowa; *transmembrane domain*; JM – domena podbłonowa; *juxtamembrane domain*; TK1, TK2 – domeny kinazy tyrozynowej; *tyrosine kinase domains*; KI – insert kinazowy; *kinase insert*. Zmodyfikowano na podstawie; *modified on the basis of*: www.alianzagist.org.

Badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych udowodniły, że blokada lub brak receptora KIT, prowadzi do zaburzeń perystaltyki jelit, wywołanej najprawdopodobniej niedoborem prawidłowych ICC [73, 99]. Ponadto wykazano, że u myszy, u których po

urodzeniu zablokowano receptor KIT, dochodzi do zaniku ICC wzdłuż jelita cienkiego przy jednoczesnym nagromadzeniu ich nieodróżnionych prekursorów i komórek przypominających komórki mięśniówki gładkiej [156]. Sugeruje to istnienie zależnego od receptora KIT procesu różnicowania ICC w komórki mięśniówki gładkiej. Oznacza to, że receptor ten odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu stanu równowagi między tymi komórkami, a tym samym w prawidłowym funkcjonowaniu przewodu pokarmowego [156].

3.2.5. Molekularne podłoże GIST

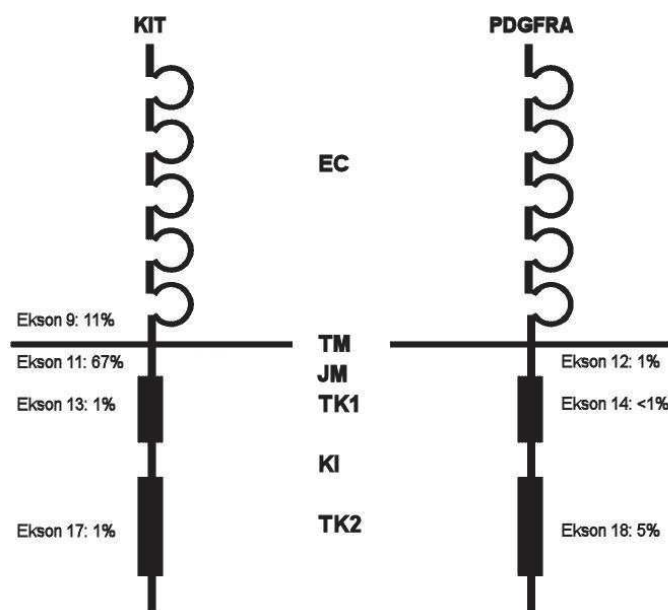
Badania immunohistochemiczne GIST wykazują ekspresję protoonkogenu *KIT* (CD117; *c-Kit*) w zdecydowanej większości guzów [65, 109, 141]. W ponad 85% przypadków za przyczynę powstania guza odpowiadają mutacje w genie *KIT* lub *PDGFRA* (*platelet-derived growth factor receptor α* – receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu α) [27, 62]. Oba te geny zlokalizowane są w regionie okołowcentromerowym w ramionach q chromosomu 4. Geny te kodują receptory wykazujące wysoką homologię zarówno pod względem budowy, jak i funkcji. Obserwowana homologia, a także lokalizacja *KIT* i *PDGFRA* sugerują, że geny te powstały najprawdopodobniej w wyniku duplikacji [53, 177]. Receptory te należą do rodziny transbłonowych białek o aktywności kinazy tyrozynowej i składają się z trzech części: zewnątrzkomórkowej, transbłonowej i wewnątrzkomórkowej (ryc. 1). Zbudowana z pięciu pętli białkowych domena zewnątrzkomórkowa (EC, *extracellular*), odpowiedzialna za wiązanie liganda, pełni funkcję receptorową. Jest ona zakotwiczona w błonie komórkowej przez hydrofobową domenę transbłonową (TM, *transmembrane*), która łączy się bezpośrednio z domeną przybłonową (JM, *juxtamembrane*) wewnątrzkomórkowej części receptora. Ta ostatnia składa się z dwóch domen kinazy tyrozynowej przedzielonych hydrofilowym insertem (KI, *kinase insert*). Pierwsza domena (TK1) stanowi rejon wiązania ATP, podczas gdy druga (TK2) wykazuje aktywność fosfotransferazy [121, 177]. Mutacje genów *KIT* i *PDGFRA* prowadzą do konstytutywnej autofosforylacji kodowanych przez nie receptorów, niezależnej od obecności lub braku liganda [107].



Ryc. 2. Fig. 2. Schemat aktywacji receptora KIT, zależnej od liganda (A) i wywołanej mutacją (B). *KIT receptor activation mechanism: by ligand (A) and mutation-driven activation (B)*. JM – nieprawidłowa konformacja domeny podbłonowej; *disrupted conformation of juxtamembrane domain*. Zmodyfikowano na podstawie; *modified on the basis of: www.gistsupport.org*.

3.2.5.1. Mutacje pierwotne genu *KIT*

Mutacje stwierdzone w obrębie genu *KIT* (ryc. 3) stanowią przyczynę od 70% do 80% zachorowań na GIST i w około 90% przypadków wykrywane są w eksonie 11 tego genu [25, 107]. Oznacza to, że zaburzenia sekwencji tego jednego eksonu odpowiadają za powstanie ponad 2/3 wszystkich GIST. Ekson 11 koduje domenę JM receptora KIT, łączącą część efektorową receptora z jego domeną TM i odgrywającą kluczową rolę w jego prawidłowym funkcjonowaniu. Pod nieobecność liganda, jej struktura zapobiega przyjęciu przez kinazę tyrozynową konformacji aktywnej. Mutacje zaburzające tę strukturę, powodują niezależną od liganda dimeryzację receptora, i aktywację jego części efektorowej (ryc. 2) [78]. Mutacje te, są przeważnie wykrywane w obszarze między kodonami 550 a 561. Ponad 60% mutacji stanowią delecje, wśród których najczęstsze dotyczą utraty kodonów 557 (Trp) i 558 (Lys) co wiąże się z gorszym rokowaniem [26, 65, 101, 152, 170]. Ponadto, często wykrywane są substytucje pojedynczych nukleotydów, głównie w kodonach 557, 559, 560 i 576. Występowanie duplikacji, insercji lub kombinacji różnych rodzajów mutacji jest rzadkie [107].



Ryc. 3. Fig. 3. Przybliżona częstość mutacji pierwotnych wykrywanych w GIST. *Approximate frequency of primary mutations in GISTs. Zmodyfikowano na podstawie; modified on the basis of: [26, 61, 88, 90, 106].*

Drugie miejsce pod względem częstości występowania w GIST zajmują mutacje w eksonie 9 genu *KIT*. Niemal wyłącznie wykrywana jest duplikacja 6 nukleotydów obejmujących kodony 502-503 (p.Ala502_Tyr503dup) [5, 87, 89, 96]. W pojedynczych przypadkach zaobserwowano duplikację p.Ser501_Ala502dup oraz p.Phe506_Phe508dup [61, 93]. Mutacje te występują w przybliżonym rejonie domeny EC (ryc. 3) i prawdopodobnie powodują zmianę konformacji, która prowadzi do dime-ryzacji sąsiadujących domen pod nieobecność liganda SCF i aktywacji kinazy tyrozynowej [178]. Mutacje eksonów 9 i 11, stanowiące zdecydowaną większość wszystkich mutacji wykrywanych w GIST, można sklasyfikować jako mutacje typu regulatorowe. Mutacje te nie występują w obrębie domeny o aktywności kinazy tyrozynowej, ale w rejonach kontrolujących jej aktywność [94].

Znacznie rzadziej występują mutacje w eksonach 13 i 17 genu *KIT* kodujących domeny enzymatyczne receptora (TK1 i TK2). Częstość występowania tych mutacji w GIST nie przekracza 2% [84]. Najczęstsza mutacja eksonu 13 to substytucja 1945A>G w kodonie 642 (NG_007456.1:p.Lys642Glu), która prowadzi do zamiany lizyny na kwas glutaminowy. Mutacja ta zlokalizowana jest w rejonie wiązania ATP kinazy tyrozynowej (ryc. 3) [84]. W pojedynczych przypadkach opisano inne substytucje, o których nie wiadomo czy prowadzą do konstytutywnej fosforylacji receptora *KIT* [84]. Mutacje eksonu 17, kodującego rejon o aktywności fosfotransferazy, to również substy-

tucje. Najczęstsza z nich to 2487T>A w kodonie 822 (NG_007456.1:p.Asn822Lys), prowadząca do zamiany asparaginy na lizynę [84]. Mutacje w eksonach 13 i 17 powodują niezależną od liganda aktywację kinazy tyrozynowej. Jednak do dnia dzisiejszego nie poznano dokładnie mechanizmu ich działania. Prawdopodobnie mutacje w eksonie 13 zaburzają autoinhibicję domeny JM, natomiast substytucje w eksonie 17 stabilizują konformację aktywną domeny enzymatycznej [25, 153].

3.2.5.2. Mutacje pierwotne genu *PDGFRA*

Wyniki dotychczasowych badań wykazały, że około 30% GIST pozbawionych mutacji w genie *KIT*, posiada mutacje w genie *PDGFRA* [107]. Mutacje te występują zatem znacznie rzadziej niż mutacje genu *KIT* i wzajemnie się z nimi wykluczają [62, 103]. W większości przypadków zaburzenia występują w eksonach 12, 14 i 18 odpowiadających eksonom 11, 13 i 17 genu *KIT* (ryc. 3) [106]. Najczęściej wykrywane są mutacje w eksonie 18, z pośród których zdecydowaną większość stanowi substytucja 2664A>T w kodonie 842 (NG_009250.1:p.Asp842Val), prowadząca do zamiany kwasu asparaginowego na walinę [85]. Inne mutacje, zarówno substytucje, jak i delecje wykrywane są rzadko [28]. Mutacje w obrębie tego eksonu powodują zmiany konformacyjne prowadzące do aktywacji kinazy tyrozynowej [136]. Występujące rzadko mutacje w eksonach 12 i 14, to głównie substytucje lub delecje, których mechanizm aktywacji receptora uważa się za analogiczny, jak w przypadku odpowiadających im mutacji w eksonach 11 i 13 genu *KIT* [28, 62, 88].

W rzadkich przypadkach mutacje w genach *KIT* lub *PDGFRA* mogą mieć charakter germinalny. U członków rodzin nimi dotkniętymi obserwuje się między innymi hiperpigmentację skóry i hiperplazję komórek ICC, a w jej konsekwencji często powstanie licznych GIST. Mutacje te są podobne do wykrywanych w guzach sporadycznych, choć w jednej rodzinie stwierdzono mutację eksonu 8 genu *KIT*. Guzy rodzinne przez długi czas mogą pozostawać łagodne, ale zazwyczaj ostatecznie ulegają zezłośliwieniu [107].

3.2.6. Inne czynniki patogenezy

Jak wspomniano, zdecydowana większość GIST charakteryzuje się obecnością mutacji w genie *KIT* lub *PDGFRA*. Istnieje jednak grupa zbliżonych klinicznie guzów, w których nie wykrywa się mutacji tych genów [25]. Są to tak zwane WT-GIST (WT, *Wild Type*). Początkowo podłoże molekularne tych guzów było nieznane, dziś jednak można wyróżnić kilka wiążących się z nimi zaburzeń. Jednym z nich są mutacje kinazy serynowo-treoninowej zaangażowanej między innymi w procesy proliferacji i różnicowania komórek [142]. Hostein i wsp. w grupie 70 GIST-WT wykryli w 9 przypadkach substytucję w kodonie 600 w eksonie 15 genu *BRAF* prowadzącą do zamiany waliny na kwas glutaminowy [68]. Ponadto u części, szczególnie młodych pacjentów, WT-GIST wiąże się z występowaniem mutacji zaburzających prawidłowe funkcjonowanie kompleksu dehydrogenazy bursztynianowej, zaangażowanego w metabolizm kwasów trójkarboksylowych i mitochondrialny przepływ elektronów [107, 114]. WT-GIST stanowią również element tzw. triady Carneya, stwierdzanej głównie u młodych kobiet i objawiającej się występowaniem licznych nowotworów płuc, żołądka, przełyku, kory nadnerczy i układu przywzwojowego [17, 114]. Mogą również występować u pacjentów z NF1 (nerwiakowłokniatowość typu 1), czyli rodzinną, dziedziczną autosomalnie dominującą chorobą, związaną z mutacją genu kodującego neurofibrominę [114, 169]. W ostatnich latach wyróżniono dodatkową grupę podobnych klinicznie guzów, niezwiązanych z żadnym z wyżej wymienionych zaburzeń. Określa się je jako „quadruple-WT GIST” (*KIT/PDGFRA/SDH/RAS*-pathway wild-type GIST) [113, 120]. Stanowią one około 5% wszystkich GIST i są przedmiotem badań, mających na celu określenie molekularnego podłoża patogenezy [120]. Do tej pory doniesiono o pojedynczych przypadkach quadruple-WT GIST, w których wykryto geny fuzyjne: *ETV6-NTRK3* oraz *FGFR1-TACCI* [14, 143]. Wyjaśnienie ich znaczenia klinicznego wymaga jednak dalszych badań. Ponadto, w niektórych guzach zidentyfikowano mutacje genu *PIK3CA* [86]. Choć we wszystkich przypadkach była to mutacja towarzysząca innym (np. *KIT* lub *BRAF*), to niewykluczone, że jest ona odpowiedzialna za oporność na imatynib [86]. Daje to nadzieję na skuteczne zastosowanie innej terapii, wycelowanej w nowoodkryty mechanizm.

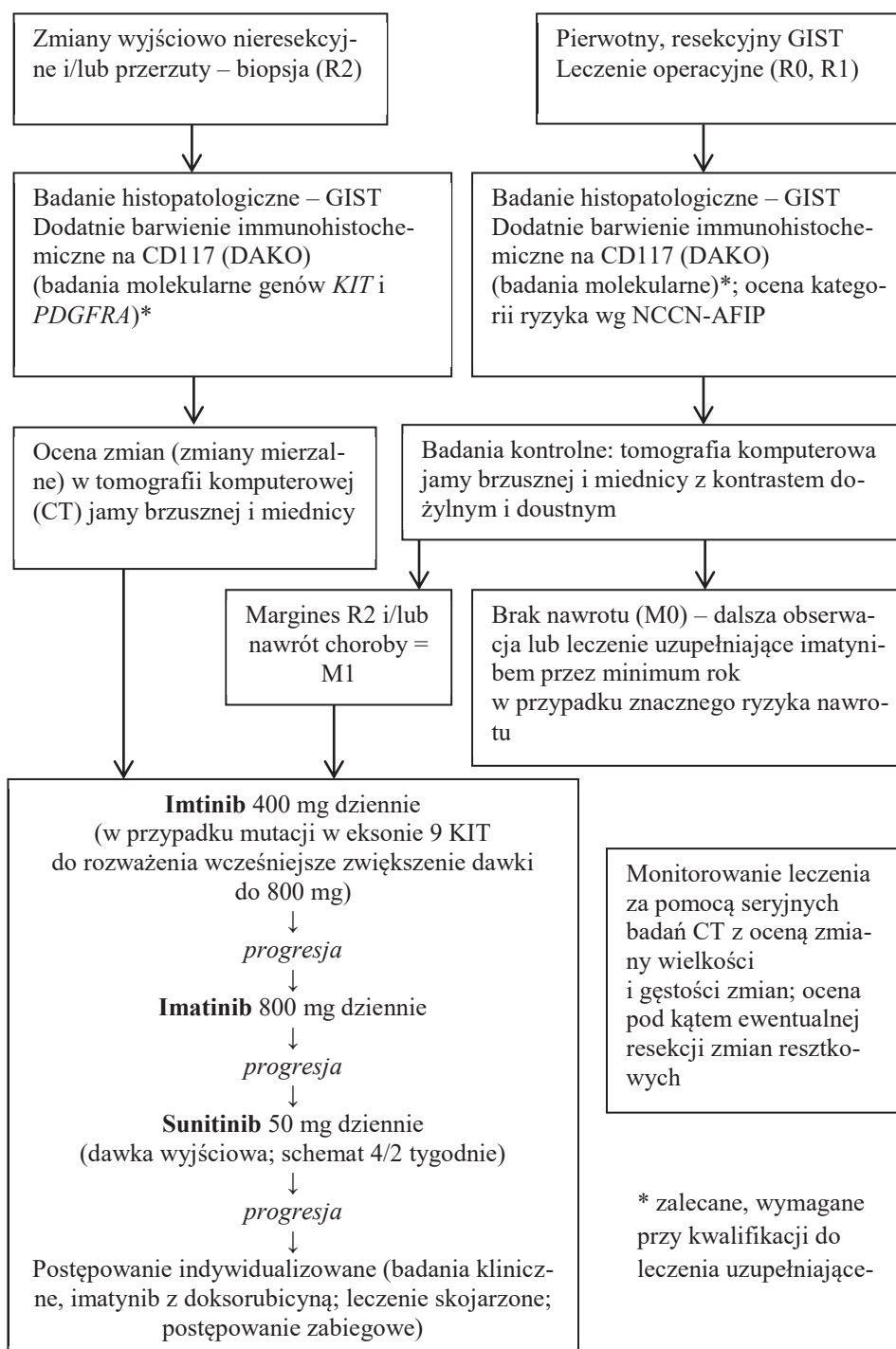
3.2.7. Diagnoza i leczenie

Podstawą rozpoznania GIST jest badanie mikroskopowe wycinków z guza nowotworowego uzupełnione badaniem immunofenotypu komórek nowotworowych. Do rozpoznania konieczne jest wykazanie dodatniej reakcji immunohistochemicznej komórek nowotworowych na obecność antygenu CD117. W związku z ograniczoną specyficznością tego markera zalecane jest wykonanie dodatkowych testów z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom: CD34 i DOG1.

Schemat postępowania (ryc. 4) po wykryciu potencjalnego GIST jest uzależniony od jego wielkości, lokalizacji i szacowanego stopnia agresywności. Jednak najpowszechniejszą i dającą najlepsze wyniki metodą leczenia jest resekcja guza [18, 106]. W przypadku podejrzenia GIST niewielkich rozmiarów (poniżej 2 cm), należących do grupy niskiego ryzyka, zaleca się ich ocenę endoskopową, a następnie obserwację pacjenta. Resekcję wykonuje się dopiero w momencie wystąpienia któregoś z objawów choroby lub wzrostu guza. Wyjątek stanowią guzy odbytu, które bez względu na wielkość, należą do grupy podwyższonego ryzyka. Dlatego też, o ile to możliwe, guzy te należy poddać natychmiastowej resekcji. W przypadku GIST większych niż 2 cm po uprzednim badaniu histologicznym należy usunąć guz. W przypadku GIST nieoperacyjnych lub rozsianych stosuje się leczenie farmakologiczne imatynibem, czyli selektywnym inhibitorem kinaz tyrozynowych [18].

Do niedawna leczenie GIST imatynibem było w Polsce ograniczone wyłącznie do nieoperacyjnych lub rozsianych guzów. Okazuje się jednak, że w niektórych przypadkach warto zastosować leczenie przedoperacyjne (neo-adjuwantowe), mogące przyczynić się do zmniejszenia guza oraz zniwelowania ryzyka jego pęknięcia podczas operacji [18]. Ponadto część pacjentów, spełniających odpowiednie kryteria, może odnieść wymierne korzyści z zastosowania pooperacyjnej terapii uzupełniającej (adjuwantowej) [19, 132]. W związku z tym, zgodnie z obwieszczeniem Ministerstwa Zdrowia z dnia 24 lutego 2014 r. (wykaz refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych na dzień 1 marca 2014 r.), umożliwiono zastosowanie refundowanej terapii uzupełniającej u pacjentów, u których stwierdza się: „obecność wysokiego ryzyka $\geq 50\%$ nawrotu po zabiegu radykalnego usunięcia nowotworu z KIT (CD117- dodatniego GIST żołądka, dwunastnicy, jelita cienkiego i odbytnicy, określonego według klasyfikacji AJCC-NCCN-AFIP); czas od

operacji pierwotnego GIST, a wdrożeniem leczenia uzupełniającego nie powinien przekroczyć 4 miesięcy; obecność mutacji *KIT* lub *PDGFR-α* z wykluczeniem mutacji *PDGFR-αD842V*”.



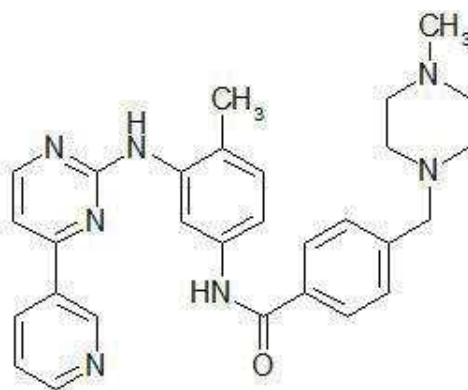
Ryc. 4. Aktualny algorytm postępowania u chorych na GIST [139].

3.3. IMATYNIB

3.3.1. Wdrożenie leku

Jak wspomniano powyżej, resekcje guzów są najskuteczniejszą metodą leczenia GIST. Standardowa chemioterapia i radioterapia w przypadku tych nowotworów często okazują się nieskuteczne [9, 38]. W związku z tym, konieczne stało się opracowanie alternatywnej terapii dla pacjentów niezakwalifikowanych do leczenia operacyjnego.

W pierwszej połowie lat 90. XX wieku, prowadzono badania nad niskocząsteczkowymi związkami chemicznymi zdolnymi do selektywnej inhibicji wybranych receptorów komórkowych. Jednym z takich związków była pochodna 2-fenyloaminopirymidynowa – CGP 57148 (imatynib, Glivec, ST1571 – ryc. 5). Substancja ta, określana jako imatynib, okazała się zdolna do hamowania autofosforylacji receptora BCR/ABL. Badania *in vitro* z wykorzystaniem komórek pacjentów z CML wykazujących ekspresję BCR/ABL wykazały, że imatynib prowadzi do zahamowania ich proliferacji oraz indukcji apoptozy. Ponadto nie zaobserwowano negatywnego wpływu cząsteczki na komórki prawidłowe czy komórki wykazujące ekspresję innych, za wyjątkiem PDGFR, receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej [15, 43, 50]. Dlatego też, imatynib wykorzystano w badaniu pierwszej fazy w grupie 83 pacjentów z CML, u których zawiodła lub nie mogła być wdrożona terapia interferonem α . Wyniki badania wykazały, że 98% pacjentów otrzymujących przynajmniej 300 mg imatynibu dziennie, uzyskało całkowitą odpowiedź hematologiczną. Ponadto, nie zaobserwowano poważnych efektów ubocznych. U części pacjentów występowały w stopniu łagodnym lub średnim nudności, bóle mięśniowe, obrzęki i biegunki [42]. Obecnie imatynib jest powszechnie stosowany w leczeniu pacjentów z CML, dając zdecydowanie lepsze wyniki w porównaniu do wcześniej wykorzystywanych terapii [66, 69].



Ryc. 5. *Fig. 5.* Wzór strukturalny 4-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]-N-[4-metylo-3-[[4-(pirydyn-3-ylo)pirymidyn-2-ylo]amino]fenylo]benzamid. *Chemical structure of 4-[(4-Methyl-1-piperazynyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-phenyl]benzamide.*

Jak już wspomniano, znane było hamujące działanie imatynibu nie tylko wobec receptora BCR/ABL, ale również PDGFRA. Wysoka homologia receptorów PDGFRA i KIT wskazywała na potencjalną aktywność imatynibu względem tego ostatniego receptora. W celu potwierdzenia tej hipotezy przeprowadzono badania z wykorzystaniem linii komórkowych, wywodzących się z ludzkiej białaczki szpikowej oraz mastocytozy, wykazujących ekspresję zmutowanych wariantów receptora KIT [63]. Okazało się, że inkubacja komórek z imatynibem prowadzi do zahamowania fosforylacji receptora i aktywności antyapoptotycznej. Ponadto wykazano, że stopień zahamowania aktywności receptora jest większy w przypadku komórek zmutowanych niż prawidłowych [63]. Obserwacje te były podstawą do próby wykorzystania imatynibu w leczeniu pacjentów z GIST.

W październiku 1996 roku u pacjentki szpitala w Helsinkach zdiagnozowano guzy przewodu pokarmowego, które po analizie histopatologicznej i molekularnej zdefiniowano jako GIST z ekspresją CD117 i delecją w eksonie 11 genu *KIT*. Chora została poddana kilkakrotnym resekcjom oraz kilku cyklom chemioterapii z wykorzystaniem mesny, doksorubicyny, ifosfamidu, dakarbazyny oraz talidomidu z interferonem α , co nie zapobiegło nawrotom i progresji choroby. W związku z tym, za zgodą pacjentki, w marcu 2000 roku zastosowano terapię imatynibem. W wyniku wdrożonej terapii doszło do zahamowania rozwoju choroby, nie zaobserwowano nowych zmian, a istniejące uległy zmniejszeniu lub całkowitej remisji. Efekty uboczne były nieznaczne i ograniczały się do zwiększenia aktywności perystaltycznej i lekkich, ustępujących obrzęków w okolicy kostek. W lutym 2001 pacjentka znajdowała się w klinicznie dobrej kondycji [75]. Późniejsze badania na linii komórkowej wywodzącej się z GIST potwierdziły hamujący

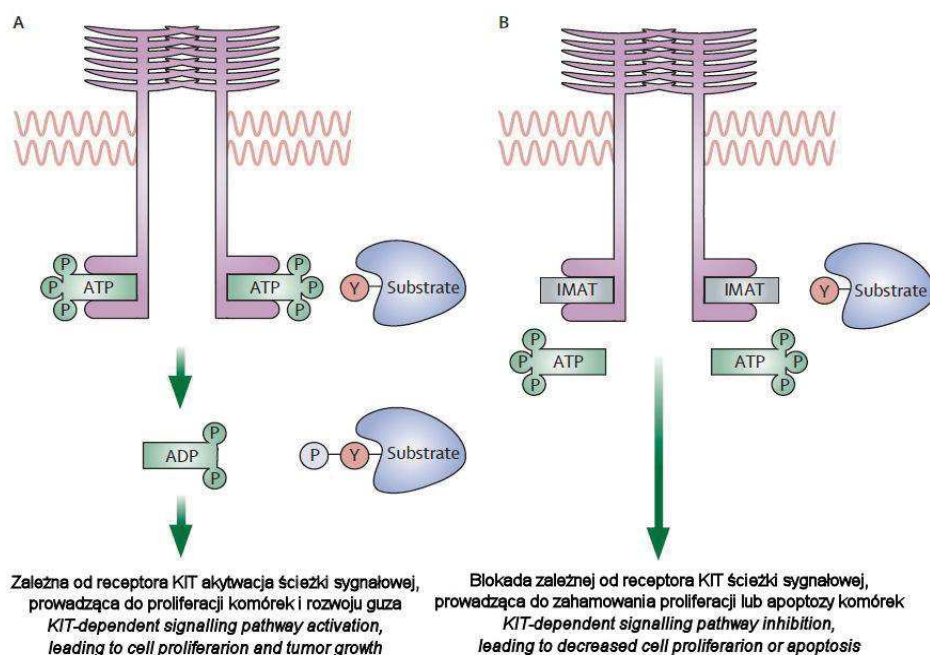
wpływ imatynibu na komórki wykazujące ekspresję nieprawidłowego receptora KIT. Badania te wykazały, że imatynib prowadzi do zahamowania fosforylacji receptora, co z kolei prowadzi do zmniejszenia proliferacji komórek, a nawet ich apoptozy [160].

Obecnie, podobnie jak w przypadku leczenia pacjentów z CML, imatynib został również włączony do rutynowego schematu leczenia u chorych na rozsia-ny/nieoperacyjny GIST (ryc. 4), co znacznie wydłuża średni czas przeżycia pacjentów (średnio o 5 lat). Imatynib coraz częściej znajduje zastosowanie w leczeniu uzupełniającym, po resekcji guza w celu zniwelowania ryzyka nawrotu lub przed zabiegiem chirurgicznym w celu zmniejszenia rozmiaru guza. Leczenie imatynibem wiąże się z niewielkimi i zazwyczaj stosunkowo łagodnymi efektami ubocznymi [107].

Wdrożenie imatynibu stanowi przełom w leczeniu GIST. Niemniej jednak pierwsze dłuższe obserwacje pacjentów poddanych terapii wykazały, że tylko około 5% chorych uzyskuje całkowitą odpowiedź na leczenie. U większości, około 50-60% pacjentów, obserwuje się częściową odpowiedź na leczenie, u kilkunastu do 30% pacjentów stabilizację choroby, a u kolejnych 10% występuje progresja choroby. Odpowiedź na leczenie jest uzależniona od wielu różnych czynników, w tym od uwarunkowań genetycznych. Na przykład, znacznie wyższy odsetek chorych, którzy uzyskali częściową odpowiedź na leczenie, obserwuje się u pacjentów z guzami, w których wykryto mutację w eksonie 11 genu *KIT* niż z mutacją w eksonie 9 [10, 35].

3.3.2. Mechanizm działania

Zarówno w przypadku CML, jak i GIST przyczyną rozwoju nowotworu jest mutacja powodująca konstytutywną, niezależną od liganda aktywację receptora. Mutacje aktywujące tych receptorów prowadzą do konstytutywnej ekspozycji substratów na działanie fosfotransferazy, co prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek. Mechanizm działania imatynibu na nieprawidłowe receptory KIT i PDGFRA (ryc. 6) polega na jego kompetycyjnym wobec ATP wiązaniu do domeny TK1 kinazy tyrozynowej, co uniemożliwia fosforylację substratu i w efekcie hamuje ścieżkę sygnałową, mimo obecności aktywnego receptora [42, 136].



Ryc. 6. Fig. 6. A – ATP przyłącza się do miejsca wiązania domeny TK1, umożliwiając fosforylację substratu i aktywację ścieżki sygnałowej. *ATP binds to its binding site in the TK1 domain of the enzyme, activating the substrate and thus signaling pathway.* B – imatynib blokuje miejsce wiązania ATP, uniemożliwiając fosforylację substratu i aktywację ścieżki sygnałowej. *Imatinib blocks ATP binding site, what inhibits substrate phosphorylation and thus signaling pathway.* Zmodyfikowano na podstawie; *modified on the basis of* [136].

3.3.3. Profil farmakokinetyczny

Zarówno w przypadku pacjentów z CML jak i z GIST profil farmakokinetyczny imatynibu jest bardzo podobny [40, 125]. Badanie z wykorzystaniem linii komórkowej z mutacją w genie *KIT* pochodzącej od pacjenta z GIST wykazało całkowite zahamowanie fosforylacji tyrozyny receptora, po osiągnięciu stężenia imatynibu równego około 1 μ M [160]. Analogiczny wynik uzyskano w podobnym badaniu przeprowadzonym na komórkach pochodzących od chorego z CML [43]. Uzyskanie i utrzymanie takiego stężenia na stałym poziomie w osoczu krwi jest możliwe po doustnym podaniu przynajmniej 350 mg imatynibu dziennie [125]. Badania nad korelacją wielkości dawki początkowej ze skutecznością leczenia, przeprowadzone w dużych grupach chorych nie wykazały związku zastosowania wyższej dawki (600-800 mg) z lepszym efektem terapeutycznym, przy jednoczesnym wzroście toksyczności [10, 11]. Z tego powodu przyjętym standardem u chorych z GIST, jest doustne przyjmowanie 400 mg metanosulfonianu imatynibu raz na dobę (ryc. 4), w formie tabletki [139]. W takiej dawce i postaci regularnie przyjmowany lek osiąga maksymalne stężenie w osoczu średnio po około trzech

godzinach od podania. Jego czas półtrwania wynosi około 19 godzin, a dostępność biologiczna sięga około 98% [124, 125]. Gdy dochodzi do progresji choroby zwiększa się dawkę dobową do 800 mg, a w przypadku wystąpienia silnej toksyczności do 600 mg [139]. W leczeniu farmakologicznym GIST istotną rolę odgrywają badania molekularne pozwalające na identyfikację obecności i rodzaju mutacji w genie *KIT* i *PDGFRA*. Wykazano, zależność pomiędzy dawką imatynibu, a odpowiedzią na leczenie w grupie pacjentów z mutacją w eksonie 9 genu *KIT*. U chorych z guzami z tą mutacją otrzymujących 800 mg zaobserwowano istotnie dłuższy czas przeżycia wolnego od progresji w porównaniu do grupy pacjentów, którzy otrzymywali 400 mg [34, 139].

3.3.4. Metabolizm i wydalanie

W stężeniach klinicznie istotnych 95% imatynibu wiąże się z białkami osocza, głównie z albuminą i α 1-kwaśną glikoproteiną (AGP). Wykazano, że interakcja imatynibu z AGP może mieć znaczenie w terapii pacjentów z CML. Metabolizm imatynibu odbywa się w wątrobie przy udziale izoenzymów cytochromu P450, głównie CYP3A4. Szereg ksenobiotyków, w tym także leków, aktywuje (np. deksametazon, fenytoina, barbituraty) lub hamuje (np. simwastatyna, cyklosporyna) funkcję tych enzymów. Jednoczesne podanie którejś z tych substancji i imatynibu może wpłynąć na zmianę jego stężenia i tempa metabolizmu. Opisano przypadek pacjenta z CML, który otrzymywał jednocześnie imatynib i fenytoinę. Pacjent ten, jako jedyny nie uzyskał całkowitej odpowiedzi hematologicznej na terapię w grupie chorych otrzymujących 350 mg imatynibu. Przyczyną było niskie stężenie imatynibu, którego wartość była zbliżona do tych obserwowanych u pacjentów otrzymujących 85 mg leku. Przerwanie leczenia fenytoiną i zwiększenie dawki imatynibu do 500 mg pozwoliło na uzyskanie całkowitej odpowiedzi hematologicznej, a stężenie imatynibu odpowiadało wartości obserwowanej u innych pacjentów otrzymujących taką dawkę [42]. W metabolizm imatynibu zaangażowane są również enzymy: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 oraz CYP3A5. Głównym metabolitem jest N-demetylowana pochodna piperazynowa (CGP 74588), która wykazuje aktywność zbliżoną do imatynibu, ale jej współczynnik stężenia w osoczu względem czasu, jest znacznie niższy i stanowi około 16% obserwowanego dla imatynibu. Jest on także substratem dla białek transportowych ABCB1 oraz ABCG2, które biorą udział w usuwaniu ksenobiotyków z komórek [16, 54]. Około 81% zaapli-

kowanej dawki ulega wydaleniu w ciągu 7 dni, z czego 68% wraz zółcią, a 13% z moczem [23, 29, 126].

3.3.5. Oporność na leczenie

Wdrożenie leczenia imatynibem u chorych z GIST okazało się pierwszą i do niedawna jedyną skuteczną terapią farmakologiczną przeciw tej chorobie. Choć odsetek całkowitych remisji jest nieznaczny, to jednak większość pacjentów przynajmniej częściowo odpowiada na leczenie. Mimo oczywistych korzyści płynących z opracowania tej terapii, przyniosła ona ze sobą również nowe problemy i wyzwania. Najpoważniejszym z nich wydaje się być kwestia oporności guzów na leczenie. U około 10% pacjentów występuje progresja choroby pomimo wprowadzenia terapii. Jeśli oporność pojawia się w trakcie pierwszych 6 miesięcy od wdrożenia imatynibu, to określa się ją jako oporność pierwotną [39]. Najpowszechniejszą jej przyczyną jest mutacja D842V (NG_009250.1:p.Asp842Val) w eksonie 18 genu *PDGFRA* [35, 61]. Jest to zarazem najczęstsza mutacja genu *PDGFRA* wykrywana w GIST. Mutacja ta występuje w eksonie kodującym domenę TK2 kinazy tyrozynowej o aktywności enzymatycznej. Mutacja ta odpowiada mutacji D816V (NG_007456.1:p.Asp816V) eksonu 17 genu *KIT*, która jest wykrywana u pacjentów z mastocytozą i odpowiada za oporność na imatynib tej grupy chorych. W obu genach powoduje substytucję prowadzącą do zamiany kwasu asparaginowego na walinę, co sugeruje duże znaczenie tego aminokwasu dla aktywności enzymatycznej receptora [61]. Obecność tej mutacji utrudnia dopasowanie cząsteczki imatynibu do miejsca wiązania i tym samym obniża jego skuteczność [98]. Ma to duże znaczenie w praktyce klinicznej, ponieważ wykrycie tej mutacji w guzie pacjenta stanowi kryterium wyłączenia z refundowanej terapii uzupełniającej po resekcji guza. Przyczyną oporności pierwotnej rzadko są mutacje genu *KIT*. Dotychczas opisano wykrycie mutacji N822K w eksonie 17 (NG_007456.1:p.Asn822Lys) czy mutacje złożone zlokalizowane w obrębie eksonu 11 u pojedynczych pacjentów z GIST [60, 153]. Oporność na leczenie warunkują również mutacje wykrywane w eksonie 9 genu *KIT*. Jednak ta oporność pierwotna ustępuje po zwiększeniu dawki imatynibu do 800 mg. Oporność pierwotną obserwuje się również w WT-GIST, w przypadku których rozwój choroby nie wiąże się bezpośrednio z zaburzeniem funkcji receptorów *KIT* i *PDGFRA* [39, 60, 107]. Podsumowując, jedyną powszechnie opisywaną mutacją pierwotną, wywołującą

oporność GIST na leczenie imatynibem, jest D842V, wykrywana w genie *PDGFRA*. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że mutacje tego genu występują znacznie rzadziej niż mutacje genu *KIT*, zjawisko oporności pierwotnej nie jest tak problematyczne jak oporność wtórna.

Oporność wtórna występuje u pacjentów początkowo odpowiadających na leczenie, u których po co najmniej 6 miesiącach dochodzi do progresji choroby [39]. Przyczynę oporności wtórnej stanowią przede wszystkim mutacje wtórne, które pojawiają się w guzach większości pacjentów [39, 107]. Powstają one podczas podziałów komórek nowotworowych i początkowo obecne są w niewielkiej ich frakcji. Jednak po rozpoczęciu terapii i pojawieniu się presji selekcyjnej, jaką wywiera imatynib, sprawiają, że liczba takich komórek wzrasta, co w efekcie prowadzi do progresji choroby, tym razem odpornej na lek. Zjawisko takie określa się jako selekcję klonalną [112, 145]. Mutacje wtórne występują w eksonach 13, 14 i 17 genu *KIT*, kodujących domeny enzymatyczne kinazy tyrozynowej. Zaburzenie tego rejonu zmniejsza powinowactwo imatynibu do miejsca wiązania (eksony 13 i 14) lub utrudnia do niego dostęp (ekson 17). Mutacje wtórne występują najczęściej u pacjentów, u których stwierdzono mutację pierwotną eksonu 11 genu *KIT*. Znacznie rzadziej obserwowane są u pacjentów z mutacją pierwotną eksonu 9 genu *KIT*. Jeśli chodzi o gen *PDGFRA*, to mutacje wtórne praktycznie nie występują, choć znany jest przypadek mutacji V561D (NG_009250.1:p.Val561Asp; ekson 12) w guzie pierwotnym pacjenta, u którego po wystąpieniu progresji w trakcie terapii, stwierdzono nową, tym razem oporną na leczenie mutację D842V [60]. Mutacji wtórnych praktycznie nie obserwuje się u pacjentów, u których wcześniej wystąpiła oporność pierwotna [4, 39, 60, 171].

Problem oporności na leczenie, szczególnie w przypadku mutacji w eksonie 9 genu *KIT*, można niekiedy rozwiązać poprzez zwiększenie dziennej dawki imatynibu. Jeśli nie ma takiej możliwości lub nie przynosi to efektu, stosuje się lek drugiej linii, czyli sunitinib. Podobnie jak imatynib, jest to inhibitor receptorów *KIT* i *PDGFRA*, ale o większym spektrum działania. Hamuje bowiem również m.in. receptory czynnika wzrostu śródbłoka naczyniowego (*VEGFR*), wywierając tym samym efekt antyangiogenetyczny, co wiąże się z poważniejszymi efektami ubocznymi. Niemniej jednak wielu pacjentów opornych na leczenie imatynibem, po wdrożeniu sunitinibu, uzyskuje istotnie dłuższe czasy przeżycia [39]. Po pojawieniu się oporności na sunitinib stosuje się lek trzeciej linii – regorafenib. Wykazano, że wydłuża on istotnie czas przeżycia wolnego

od progresji, choć nie wpływa na całkowity czas przeżycia chorych. Stosuje się go w 28-dniowych cyklach, aż do wystąpienia progresji lub zbyt nasilonej toksyczności [129]. Wystąpienie oporności na regorafenib, nie pozostawia obecnie pacjentom dalszej możliwości skutecznego leczenia farmakologicznego. Prowadzone są jednak badania nad inhibitorami kolejnych generacji, takich jak: sorafenib, dasatinib czy nilotinib. Badania dają nadzieję na opracowanie, w oparciu o te substancje, terapii przeciw guzom opornym na oba wcześniej stosowane leki [39].

Na podstawie dotychczasowych obserwacji można stwierdzić, że badania molekularne GIST stanowią kluczowy element oceny rokowania i szans powodzenia terapii z wykorzystaniem imatynibu. W oparciu o ich wyniki, podejmowane są decyzje o kierunku dalszego, zindywidualizowanego postępowania klinicznego. Ponadto znamy, dzięki nim, spektrum mutacji w genach *KIT* i *PDGFRA*, będących przyczyną choroby, co pozwala skuteczniej opracowywać terapie celowane. Najliczniejszą grupę chorych stanowią pacjenci, w guzach których wykrywa się mutacje w eksonie 11 genu *KIT*. Jest to zarazem grupa, która najlepiej odpowiada na leczenie imatynibem. Niestety, mimo terapii, u większości pacjentów dochodzi po pewnym czasie do progresji choroby, co jest związane z wystąpieniem mutacji wtórnych. Okres tego czasu jest jednak bardzo różny, nawet pomiędzy pacjentami, u których wykryto podobne mutacje w guzach pierwotnych i może wynosić od kilku miesięcy do kilku lat. Różnice te może tłumaczyć wiele czynników. Za jeden z nich uważa się profil farmakokinetyczny imatynibu, indywidualny dla każdego pacjenta. Jeśli na przykład, w trakcie trwania terapii wystąpi zwiększenie tempa metabolizmu i usuwania imatynibu z ustroju, może dojść do obniżenia stężenia leku wobec zaplanowanej wartości, a tym samym, do zmniejszenia ekspozycji komórek nowotworowych na jego działanie [171]. Może to być przyczyną wcześniejszego wystąpienia progresji choroby. Metabolizm, transport i usuwanie imatynibu z organizmu, to parametry ściśle związane z wydajnością enzymów zaangażowanych w przemianę ksenobiotyków. Wydajność ta zależy między innymi od obecności w organizmie induktorów i inhibitorów enzymów metabolizujących imatynib, dlatego należy zwracać szczególną uwagę na inne leki i substancje czynne, jakie przyjmuje pacjent. Zależy jednak ona również od indywidualnego dla każdego pacjenta profilu genetycznego.

Białka zaangażowane w metabolizm i transport imatynibu, występują w wielu wariantach polimorficznych, które mogą znacząco różnić się aktywnością lub powinowac-

twem do substratu. Oznacza to, że profil genetyczny pacjenta może wpływać na takie parametry, jak poziom leku czy tempo jego usuwania, oddziałując tym samym na skuteczność terapii. Zatem zakres zainteresowania biologii molekularnej, w kontekście terapii przeciwnowotworowej, nie może ograniczać się jedynie do oceny rodzaju mutacji w guzie. Powinien również objąć możliwy wpływ wariantów polimorficznych enzymów metabolizujących imatynib na wynik terapii. Do białek zaangażowanych w przemianę imatynibu, należą m.in. niektóre izoenzymy cytochromu P450 (np. CYP3A4, A5) czy też białka transportowe ABC (ABCB1, ABCG2).

3.4. ENZYMY ZWIĄZANE Z METABOLIZMEM I TRANSPORTEM IMATYNIBU

3.4.1. Wybrane polimorfizmy białek enzymatycznych metabolizujących imatynib

Metabolizm ksenobiotyków, a więc również leków przeciwnowotworowych, w tym także imatynibu, odbywa się głównie przy udziale enzymów cytochromu P450. Stanowią one olbrzymią grupę hemoprotein, których przedstawiciele obecni są w każdym organizmie. Przypuszcza się, że przodkiem tej licznej współcześnie grupy był gen, występujący w prostych organizmach sprzed ery eukariontów i bogatej w tlen atmosfery. Wraz z postępowaniem zmian klimatycznych i pojawianiem się coraz bardziej różnorodnych i skomplikowanych form życia, dochodziło prawdopodobnie do kolejnych duplikacji tego genu i przyjmowania nowych funkcji przez jego kolejne wersje. Wspólnie z naturalnymi mechanizmami odpowiedzialnymi za występowanie różnorodności genetycznej, doprowadziło to do powstania jednej z większych, znanych dziś nadrodzin białek, które zaangażowane są w szereg kluczowych procesów życiowych. W przypadku ssaków występują one niemal w każdej tkance, a ich lokalizacja komórkowa dotyczy przede wszystkim retikulum endoplazmatycznego (frakcja mikrosomalna) i błony mitochondriów. Najciekawsza z medycznego punktu widzenia jest oczywiście ludzka grupa przedstawicieli enzymów cytochromu P450. Znanych jest 57 kodujących je genów, podzielonych na 18 rodzin. Największe i w kontekście metabolizmu leków najważniejsze, są rodziny *CYP1*, *CYP2* i *CYP3* [30, 115]. Kilku przedstawicieli tych rodzin jest w różnym stopniu zaangażowanych w metabolizm imatynibu, są to między innymi: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9*, *CYP2C19* oraz *CYP2D6*. Jak wspomniano wyżej, geny cytochromu P450, w tym także te przed chwilą wymienione, charakteryzują się występowaniem w wielu wariantach polimorficznych. Niektóre z tych wariantów mogą powodować zmiany w ekspresji, budowie lub funkcji kodowanych białek, co z kolei, może przekładać się na wydajność metabolizmu określonych substratów. Poniżej przedstawiono kilka wybranych polimorfizmów, które mogą mieć znaczenie w procesach przemian niektórych leków.

3.4.1.1. Polimorfizm *CYP3A4*1B*

Metabolizm imatynibu odbywa się głównie w wątrobie, przy udziale enzymów z grupy CYP3A, a przede wszystkim izoenzymu CYP3A4 [29, 126]. Hemoproteiny z tej grupy odpowiadają za biotransformację około 50% wszystkich metabolizowanych farmaceutyków [163, 172]. Sam izoenzym CYP3A4 jest prawdopodobnie najistotniejszym, z punktu widzenia metabolizmu leków, przedstawicielem cytochromu P450. Charakteryzuje się olbrzymim spektrum substratów, odpowiadając za metabolizm 120 leków. Uważa się również, że w przynajmniej pewnym stopniu jest zaangażowany w przemianę około 60% wszystkich farmaceutyków będących w użyciu. Występuje w wątrobie, gdzie stanowi do 60% wszystkich obecnych tam przedstawicieli cytochromu P450, a także w jelitach [30]. Gen *CYP3A4* jest zlokalizowany na chromosomie 7 i składa się z 13 eksonów [57]. Opisano ponad 30 dotyczących go polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, *single nucleotide polymorphism*), czyli wariantów allelicznych różniących się między sobą tylko jednym nukleotydem. Jednym z nich jest najwcześniej opisany polimorfizm tego genu: *CYP3A4*1B* (rs2740574), który prowadzi do -392A>G w rejonie promotorowym [163]. Wykazano jego związek z bardziej agresywnym zachowaniem raka prostaty [131]. Jest również możliwe, że polimorfizm ten powoduje wzrost ekspresji kodowanego enzymu, co oznaczałoby podwyższenie jego aktywności [1]. To z kolei mogłoby się przełożyć na zwiększenie tempa metabolizmu substratów, a tym samym na obniżenie ich stężenia w ustroju. Taki scenariusz zdają się potwierdzać badania przeprowadzone u osób po przeszczepie nerki, przyjmujących takrolimus, który jest metabolizowany między innymi przy udziale izoenzymu CYP3A4. Wykazano statystycznie istotnie niższy poziom leku u nosicieli przynajmniej jednego allelu *CYP3A4*1B*, względem homozygot WT [64]. Z drugiej jednak strony, wyniki badania przeprowadzonego w Australii w grupie chorych na raka piersi lub jajnika, wykazały brak związku tego polimorfizmu z przebiegiem choroby. Podważono również jego istotne znaczenie w regulacji transkrypcji [144]. Taki stan rzeczy uniemożliwia uniwersalną ocenę znaczenia tego polimorfizmu i uzasadnia przeprowadzenie stosownych badań w sytuacjach, w których mamy do czynienia z powszechnym stosowaniem substratów dla kodowanego przezeń enzymu.

3.4.1.2. Polimorfizm *CYP3A5*3C*

Drugim enzymem z rodziny CYP3A, zaangażowanym w metabolizm imatynibu, jest CYP3A5 [37, 126]. Jest on kodowany przez identycznie nazwany gen, który podobnie do *CYP3A4* znajduje się na chromosomie 7 [163]. Jego ekspresję stwierdza się m.in. w płucach, nerkach czy w przysadce [30, 83, 163, 172]. W przypadku wątroby przyjmuje się, że jest ona niższa od ekspresji *CYP3A4* i zarazem trudna do jednoznacznego oszacowania z uwagi na duże różnice etniczne, związane z częstością występowania niefunkcjonalnego allelu *CYP3A5*3C* [83, 163]. Spektrum substratów dla enzymów CYP3A4 i A5 w znacznej mierze się pokrywa, w związku z czym, można je w pewnym sensie traktować jako wzajemnie uzupełniający się układ [163, 172]. Oznacza to, że udział obu tych enzymów w metabolizmie danego substratu nie jest zawsze jednakowy i zależy od indywidualnych uwarunkowań genetycznych [163]. W tym kontekście szczególnego znaczenia nabiera wspomniany, wykrywany w intronie 3, wariant polimorficzny *CYP3A5*3C* (rs776746; 6986A>G), który powoduje alternatywne składanie i skrócenie produktu białkowego, w skutek pojawienia się kodonu stop, czego rezultatem jest absencja funkcjonalnego enzymu [83]. Szacuje się, że u Amerykanów europejskiego pochodzenia i Europejczyków (populacja kaukaska), częstość tego wariantu wynosi od 60 do 90% [83, 163, 165]. Obecność prawidłowego allelu, wykrywanego u większości Afroamerykanów i nieznacznej części przedstawicieli populacji kaukaskiej, powoduje zrównanie poziomów ekspresji enzymów CYP3A4 i A5 we frakcji wątrobowej [83]. W takiej sytuacji udział obu enzymów w wątrobowym metabolizmie leków może być podobny. Niemniej jednak, u większości przedstawicieli populacji kaukaskiej, w tym mieszkańców Polski, obserwuje się brak funkcjonalnego wariantu CYP3A5, co może mieć znaczenie kliniczne. Okazuje się, że obecność nieaktywnego wariantu koreluje ze zmniejszeniem dawki koniecznej do uzyskania zamierzonego stężenia leku takrolimus u pacjentów po przeszczepie nerki, ze wspomnianego już wyżej badania [64].

3.4.1.3. Polimorfizmy *CYP2: C9*2, C19*2, C19*3 oraz D6*4*

Enzymy z rodziny CYP2 stanowią największą grupę ludzkich przedstawicieli cytochromu P450, składając się na niemal jedną trzecią zidentyfikowanych w jego ramach sekwencji [30]. Niektóre izoenzymy z tej rodziny (CYP2C9 i 19 oraz CYP2D6), ogry-

wają pewną rolę w metabolizmie imatynibu, choć ich udział w tym procesie, jest mniejszy niż w przypadku enzymów CYP3A4 i A5 [29, 126]. Może się to wiązać z ich niewielkim, względem rodziny CYP3, udziałem we frakcji wątrobowej cytochromu P450 – tylko CYP2A6 osiąga w niej znaczący poziom [30]. Podrodzina CYP2C składa się z 4 genów: *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C18* i *CYP2C19*, które mieszczą się w chromosomie 10, i których produkty zaangażowane są w metabolizm około 20% leków [30, 163]. Wśród genów tych zidentyfikowano warianty polimorficzne, które mogą mieć istotny wpływ na procesy biotransformacji niektórych substancji czynnych.

CYP2C9*2 (rs28371674) jest polimorfizmem wykrywanym, w zbudowanym z dziewięciu eksonów, genie *CYP2C9*, którego udział we frakcji wątrobowej, jest w ramach podrodziny CYP2C największy [31, 44, 135]. Wariant ten dotyczy eksonu 3, w którym dochodzi do tranzycji 430C>T, powodującej w kodowanym białku substytucję argininy cysteiną (R144C) [135]. Może to być przyczyną obniżenia powinowactwa enzymu do, przynajmniej części, jego substratów. Zaobserwowano na przykład, że wśród pacjentów przyjmujących warfarynę, ci będący nosicielami allelu *CYP2C9*2*, potrzebują niższej dawki leku, niż pacjenci WT [49]. Wiąże się to prawdopodobnie ze zmniejszeniem tempa metabolizmu warfaryny u pacjentów, którzy są nosicielami tego polimorfizmu [135, 147].

CYP2C19*2 oraz ****3*** to warianty polimorficzne genu *CYP2C19*, kodującego enzym występujący w wątrobie, dwunastnicy i jelicie cienkim [79]. Jest on przede wszystkim odpowiedzialny za metabolizm mefenytoiny, z grupy leków przeciwpadaczkowych, a także diazepam, omeprazolu, niektórych leków przeciwnowotworowych i szeregu antydepresantów [30, 163]. Kliniczne znaczenie tych polimorfizmów zostało po raz pierwszy opisane w związku z upośledzeniem metabolizmu mefenytoiny, będącego wynikiem absencji funkcjonalnego enzymu [32, 33]. Wariant *CYP2C19*2* (rs4244285), wykrywany w eksonie 5, powoduje tranzycję 681G>A, wskutek czego dochodzi do defektu składowania i ostatecznie do powstania skróconego, nieaktywnego enzymu [33]. Drugi polimorfizm, *CYP2C19*3* (rs4986893), prowadzi do tranzycji 636G>A w eksonie 4, czego efektem jest wprowadzenie kodonu stop i tym samym brak funkcjonalnego produktu białkowego [32]. Obecność jednego z tych wariantów w układzie homozygotycznym lub obu w układzie heterozygotycznym, jest określana, wobec aktywności enzymu CYP2C19, jako fenotyp słabego metabolizmu [20]. Wykazano jego związek ze

zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka wątrobowo-komórkowego, u nosicieli wirusa HCV z marskością wątroby [20]. Ponadto, otrzymujący kłopidogrel, pacjenci z chorobami wieńcowymi, którzy są nosicielami wariantu *CYP2C19*2*, wymagają istotnie wyższej dawki leku w porównaniu z homozygotami WT [104].

*CYP2D6*4* to polimorfizm genu *CYP2D6*, będącego jedynym funkcjonalnym przedstawicielem podrodziny CYP2D [30]. Złożony z dziewięciu eksonów gen mieści się na chromosomie 22, a kodowany przez niego enzym jest obecny przede wszystkim w wątrobie, jak również w mózgu i jelicie cienkim [59, 122]. Charakteryzuje się on szerokim spektrum substratów, będąc zaangażowanym w metabolizm wielu farmaceutyków, w tym: β -blokerów, antydepresantów oraz leków przeciwbólowych, przeciwpsychotycznych, przeciwartmicznych i przeciwnowotworowych [30, 163]. W sumie bierze on udział w przemianach nawet 25% wszystkich leków, a wykrywane w jego ramach warianty genetyczne wywierają wpływ na metabolizm około 50% z nich. Czyni go to, najważniejszym, polimorficznym enzymem związanym z biotransformacją farmaceutyków [72]. Istnieje ponad 60 znanych alleli tego genu, w różnym stopniu oddziałujących na jego funkcję. Za jeden z istotniejszych, a w kontekście fenotypowego efektu słabego metabolizmu być może najistotniejszy, uważa się wariant *CYP2D6*4* (rs1800716), obecny na granicy 3 intronu i 4 eksonu, i powodujący błędne składania genu [55, 72]. Wskutek tego powstaje skrócone, niefunkcjonalne białko [55]. Może być to przyczyną spadku tempa metabolizmu wielu leków, co z kolei przekłada się na efektywność terapii. W jednym z badań wykazano, że pacjenci z chorobami psychicznymi, leczeni substratami dla genu *CYP2D6*, będący nosicielami jego niefunkcjonalnych alleli, charakteryzowali się poważniejszymi efektami ubocznymi i dłuższym pobytem w szpitalu niż nosiciele prawidłowych wersji genu [22]. W przypadku chorób nowotworowych obecność tego wariantu również może mieć znaczenie. Wykazano na przykład, jego związek z istotnie niższym stężeniem aktywnego metabolitu tamoksifenu u przyjmujących ten lek pacjentek z rakiem piersi [74].

3.4.2. Wybrane polimorfizmy transporterów białkowych

Przebieg metabolizmu wielu leków zależy m.in. od wydajności enzymów odpowiedzialnych za ten proces. W przypadku imatynibu, odbywa się on głównie w wątrobie, przy udziale niektórych izoenzymów mikrosomalnej frakcji cytochromu P450. Wystę-

pują one w wielu wariantach polimorficznych, z których kilka, mogących wpływać na przebieg biotransformacji, opisano powyżej. Jednak nie tylko wydajność metabolizmu leku ma związek z efektem terapeutycznym. Może go również mieć ilość farmaceutyku, jaka zostanie poddana przemianom w określonym czasie (innymi słowy: ile leku trafi w danym okresie do komórki i jak długo w niej pozostanie). To zaś zależy od funkcji białek zaangażowanych w komórkowy „napływ” i „odpływ”, czyli transport ksenobiotyków. Proteiny te można podzielić na dwie grupy: ABC (*ATP-binding cassette*) i SLC (*solute-carriers*) [48, 58]. Ludzka rodzina transporterów ABC liczy 48 genów, których produkty to białka transbłonowe wykorzystujące energię ATP do aktywnego transportu wielu substancji chemicznych, w tym także leków, głównie z wnętrza do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [34]. Wśród tych genów szczególną uwagę nauki cieszą się dwa najczęściej badane: *ABCB1* oraz *ABCG2*. Zainteresowanie to wiąże się m.in. z ich aspektem farmakogenetycznym, mającym znaczenie w wielu terapiach [48]. Drugą grupę stanowią transportery ze znacznie większej, ale nie tak intensywnie badanej nadrodziny SLC. Liczy ona 55 rodzin genów, kodujących ponad 360 białek błonowych. Działają one najczęściej na zasadzie transportu pasywnego, pośrednicząc w przemieszczaniu cząstek przez błony lipidowe zgodnie z gradientem stężeń lub ko-transportu, polegającego na jednoczesnym ruchu dwóch cząstek, z których jedna przemieszcza się zgodnie z gradientem, podczas gdy druga wbrew niemu. Substratami dla transporterów SLC są przede wszystkim substancje endogenne. Uważa się jednak, że niektóre ksenobiotyki mogą niejako „oportunistycznie” korzystać z pośrednictwa białek SLC, dostając lub wydostając się z komórek [58]. Podobnie jak w przypadku cytochromu P450, w ramach obu wyżej wymienionych rodzin genów, występuje wiele wariantów polimorficznych, mogących wpływać na funkcję białek, a tym samym na przebieg i skuteczność terapii angażujących chemiczne związki egzogenne [48]. Poniżej przedstawiono cztery wybrane polimorfizmy genów kodujących transportery białkowe.

3.4.2.1. Polimorfizm *ABCB1* 3435C>T

Funkcjonalne białka z rodziny ABC zbudowane są zazwyczaj z czterech domen: dwóch TM oraz dwóch NBFs (*nucleotide-binding folds*). Zakotwiczone w błonie domeny TM odpowiadają za określenie specyfikacji substratowej, natomiast obecne w cytoplazmie domeny NBFs, stanowią rejon wiązania ATP. Białka ABC występują w postaci

kompletnych transporterów (zbudowanych ze wszystkich 4 domen) lub tzw. pół-transporterów, które uzyskują funkcjonalność po utworzeniu homo lub heterodimerów [34]. Do kompletnych transporterów należy ABCB1 (znany również jako glikoproteina P), który jest zarazem pierwszym i najlepiej poznanym przedstawicielem całej rodziny ABC [48, 95]. Gen *ABCB1* zbudowany jest z 28 eksonów, mieszczących się na chromosomie 7 [48]. Jego wcześniejsza nazwa *MDR1*, wynika z fenotypowego efektu MDR (*multi-drug resistance*), polegającego na zwiększonej oporności na leczenie farmakologiczne, nowotworów z podwyższoną ekspresją białka ABCB1, zaangażowanego w usuwanie ksenobiotyków z komórki [12, 48]. Wykazano, na przykład, istnienie związku nadekspresji białka ABCB1 w linii komórkowej wywodzącej się z CML, z opornością tych komórek na działanie imatynibu [100]. Sama zatem obecność tego transportera w tkance nowotworowej może wpływać na skuteczność terapii. W zdrowych tkankach, ekspresję ABCB1 obserwuje się w określonych komórkach wątroby, jelit, nerek, nadnerczy i trzustki, a także w komórkach śródbłonna naczyń włosowatych, wchodzących w skład bariery krew-mózg [24, 154]. W ramach sekwencji kodującej ten transporter, opisano ponad 100 wariantów polimorficznych, spośród których jednym z najczęściej badanych jest *ABCB1* 3435C>T (rs1045642) [48]. Jego obecność w układzie homozygotycznym (*TT*) powoduje spadek ekspresji białka, co może być efektem obniżonej stabilności mRNA zawierającego ten wariant [67, 168]. Jednak związek tego polimorfizmu ze skutecznością farmakologicznych terapii przeciwnowotworowych nie jest jednoznaczny. W jednym z badań nad jego wpływem na efekt leczenia imatynibem pacjentów z CML, nie wykazano istotnej korelacji jego obecności ani ze stężeniem imatynibu u chorych, ani też z efektem terapeutycznym [148]. Z drugiej strony wyniki innych badań wykazały, że wśród pacjentów z CML leczonych imatynibem, istnieje związek obecności wariantu *T*, z gorszą odpowiedzią na leczenie [116]. Okazało się również, że chorzy z CML, będący homozygotami *TT*, mają mniejsze szanse na uzyskanie większej lub całkowitej odpowiedzi molekularnej, na terapię imatynibem [36]. Mimo rozbieżności wyników badań, można powiedzieć, że polimorfizm *ABCB1* 3435C>T nie jest bez znaczenia w terapiach angażujących imatynib.

3.4.2.2. Polimorfizm *ABCG2* 421C>A

Drugim przedstawicielem rodziny transporterów ABC jest *ABCG2*. Gen kodujący to białko składa się z 16 eksonów i znajduje się w chromosomie 4 [6]. Inna nazwa tego genu – *BCRP* (*breast cancer resistance protein*) – wynika z faktu, że został on wyizolowany z opornych na mitoksantron, doksorubicynę i daunorubicynę komórek raka piersi, w których jego obecność była przyczyną fenotypu MDR [41]. *ABCG2* jest pół-transporterem, który podobnie jak *ABCB1*, bierze udział w przemieszczaniu substratów z wnętrza komórki poza nią. Jego ekspresja tkankowa jest zbliżona do prezentowanej przez *ABCB1* i obejmuje: wątrobę, nerki, jelita, mózg, a także dodatkowo gruczoły mlekowe, w których w okresie laktacji bierze udział w transporcie witaminy B2 do mleka [48, 162]. W ramach sekwencji genu *ABCG2*, również wykryto szereg wariantów polimorficznych, mogących wpływać na funkcję białka. Szczególnie interesujący wydaje się polimorfizm 421C>A (rs2231142), powodujący zastąpienie glutaminy lizyną w kodonie 141 (Q141K). Komórki z ekspresją tego wariantu charakteryzują się zmniejszoną ekspresją białka i obniżoną lekoopornością, względem komórek WT [71]. Ponadto wykazano, że obecność wariantu C niekorzystnie wpływa na uzyskanie przez leczonych imatynibem pacjentów z CML, większej lub całkowitej odpowiedzi molekularnej [76]. Z kolei inny zespół powiązał ten polimorfizm z różnicami w stężeniu imatynibu w osoczu chorych z CML [148]. Wcześniejsze badania natomiast, przeprowadzone w grupie chorych z GIST, wskazały na brak związku tego wariantu z profilem farmakokinetycznym imatynibu [51]. Ostatnio jednak przebadano większą grupę pacjentów z GIST i wykazano istnienie wpływu polimorfizmu 421C>A, na wolny od progresji czas przeżycia tych chorych [82]. Zatem podobnie jak w przypadku opisanego wyżej wariantu genu *ABCB1*, tak i w tym wypadku, istnieją rozbieżności w ocenie jego klinicznego znaczenia. Nie ulega jednak wątpliwości, że w określonych okolicznościach może on modyfikować działanie i tym samym skuteczność leku.

3.4.2.3. Wybrane polimorfizmy genów *SLC22A4* oraz *SLC22A5*

Drugą nadrodzinę transporterów stanowią białka SLC, tworzące 55 rodzin. Mimo takiego ich usystematyzowania, podstawy podziału nie stanowi ich pokrewieństwo ewolucyjne, które uważane jest za niewystarczające (wyjątki stanowią rodziny *SLC25*

oraz SLCO), a jedynie ich spektrum substratowe [58]. W ten sposób wyodrębniono rodzinę SLC22, której przedstawiciele to transportery organicznych kationów, anionów i jonów obojnaczych. Proteiny z tej grupy, zbudowane są z 12 domen TM i 2 dużych, hydrofilowych pętli: zewnątrzkomórkowej (między TM1 i TM2) oraz wewnątrzkomórkowej (między TM6 i TM7) [81]. Biorą udział w absorpcji i wydzielaniu lub wydalaniu substancji endogennych oraz ksenobiotyków, w tym także leków, w jelitach, wątrobie i nerkach. W ramach tej rodziny wyodrębnia się 3 grupy: transportery kationów organicznych (OCT), transportery anionów organicznych (OAT) oraz transportery kationów i jonów obojnaczych OCTN [80]. Do tej ostatniej grupy należą białka OCTN1 i OCTN2, które biorą udział w transporcie niektórych leków [80, 81]. OCTN1 jest kodowany przez gen *SLC22A4*, który mieści się na chromosomie 5 [45]. Jego ekspresja dotyczy głównie mięśni szkieletowych, nerek, jelita cienkiego, płuc, serca, prostaty i łożyska [150]. Wykazano, że polimorfizm w jego obrębie może mieć związek z podatnością na reumatoidalne zapalenie stawów [155]. Wyników tych nie potwierdzono jednak w podobnych badaniach przeprowadzonych w Wielkiej Brytanii [7]. Jednym z badanych wariantów był polimorfizm *SLC22A4 1672C>T* (rs1050152; L503F). Jest on przyczyną zaburzenia specyfikacji substratowej kodowanego białka [161]. Wyniki kilku innych badań wskazują na jego związek z podatnością na chorobę Leśniowskiego-Crohna [92, 123, 128]. Stanowiło to zachętę do sprawdzenia roli tego polimorfizmu w innych schorzeniach przewodu pokarmowego, między innymi w raku jelita grubego, w przypadku którego okazał się on nie mieć jednak znaczenia [146]. Odmienne wyniki otrzymano w badaniach przeprowadzonych w grupach chorych z CML i GIST leczonych imatynibem. W przypadku pacjentów z CML obecność wariantu *C* wiązała się z lepszym rokowaniem w kontekście uzyskania większej odpowiedzi molekularnej [3]. Zbliżone wyniki otrzymano w grupie chorych z GIST, w której również obecność wariantu *C* sprzyjała wydłużeniu czasu upływającego od rozpoczęcia terapii do progresji choroby [2]. Mimo, że nie ma pewności czy i w jakim stopniu OCTN1 jest zaangażowany w absorpcję imatynibu, to jednak powyższe wyniki sugerują związek tego białka z efektem terapii wykorzystujących imatynib [3]. Drugim z przedstawicieli rodziny SLC22 jest OCTN2, kodowany przez mieszczący się na chromosomie 5 gen *SLC22A5* [45]. Wykazuje on silną homologię wobec OCTN1, ale jego ekspresja tkankowa jest powszechniejsza, wykryto ją bowiem dodatkowo, między innymi w: trzustce, wątrobie, mózgu czy macicy [149]. Jeden z polimorfizmów genu *SLC22A5 -2087G>C*

(rs2631372) okazał się mieć związek z podatnością na chorobę Leśniewskiego-Crohna, co wynikało z obniżonej ekspresji genu *SLC22A5* u homozygot *CC* [134]. Niekorzystny wpływ tego genotypu wykazano również w przypadku leczonych imatynibem pacjentów z GIST, wiązał się on bowiem ze skróceniem czasu od rozpoczęcia terapii do progresji choroby [2].

Z przytoczonych publikacji w literaturze naukowej wynika, że wszystkie opisane powyżej polimorfizmy mogą wpływać na przebieg niektórych chorób, także w kontekście terapii angażujących imatynib. W związku z tym, zdecydowano się przebadać te warianty w ramach niniejszego projektu w grupie 101 pacjentów z nieoperacyjnymi/rozszanymi GIST, leczonych w kilku ośrodkach w Polsce.

4. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było zbadanie związku wybranych wariantów polimorficznych w obrębie genów cytochromu P450 i transporterów ABC i SLC z efektem leczenia imatynibem w grupie 101 chorych z guzami podścieliska przewodu pokarmowego. Analiza ta polegała na ocenie wpływu tych polimorfizmów na czas, jaki upłynął od rozpoczęcia terapii do progresji choroby.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. BADANA GRUPA

Do badań molekularnych zakwalifikowano pacjentów z nieoperacyjnymi lub rozsia-
nymi GIST, którzy zostali poddani leczeniu imatynibem. Udział w badaniu był dobro-
wolny. Wszyscy zakwalifikowani pacjenci podpisali deklaracje świadomej zgody na
udział w badaniu.

Badania molekularne wykonano w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Me-
dycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego po wcześniejszym uzyskaniu zgody
Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwer-
sytecie Medycznym.

Do badań zostali włączeni pacjenci z GIST, u których oznaczono obecność i rodzaj
mutacji w guzie pierwotnym oraz którzy nie kwalifikowali się do resekcji zmian – tera-
pia farmakologiczna imatynibem. Na podstawie rodzaju mutacji genów *KIT* i *PDGFRA*
pacjenci zostali podzieleni na odpowiednie podgrupy (tabela 6).

Tabela 6. *Table 6.* Podział pacjentów na podstawie rodzaju mutacji w guzie pierwotnym. *Patients group assignment in accordance to primary tumor mutation type.*

	Zmutowany gen / mutated gene				WT
	<i>KIT</i>		<i>PDGFRA</i>		
	Ekson 9	Ekson 11	Ekson 14	Ekson 18	
Liczba pacjentów n (%) <i>Number of patients</i>	11 (10,9)	71 (70,3)	1 (1)	5 (4,9)	13 (12,9)

WT – brak mutacji w genie *KIT* lub *PDGFRA*; *no mutation in KIT nor PDGFRA*

W tabeli, oprócz zgodnego z rodzajem mutacji w guzie pierwotnym podziału pa-
cjentów na podgrupy, podano częstość poszczególnych mutacji w badanej grupie.
Zgodnie z przewidywaniami, najliczniejszą grupę stanowili pacjenci z guzami z mutacją
w eksonie 11 genu *KIT*. W związku z niewystarczającą liczebnością pozostałych grup,
analiza statystyczna została przeprowadzona jedynie w grupie pacjentów z guzami
pierwotnymi z mutacją w eksonie 11 genu *KIT*. Charakterystykę tej grupy przedstawi-
no w tabeli 7.

Tabela 7. *Table 7.* Charakterystyka badanej grupy pacjentów (guz pierwotny z mutacją w eksonie 11 genu *KIT*). *Characteristics of patients enrolled for further analysis (primary tumor with KIT mutation in exon 11).*

Liczba chorych <i>Number of patients</i>	Wiek w latach ¹ <i>Age in years¹</i>		Płeć <i>Sex</i>		Początkowa dawka imatinibu <i>Starting imatinib dose</i>		
	zakres <i>range</i>	średnia <i>mean</i>	K	M	400 mg	800 mg	b.d.
71	30 – 78	57	28	43	68	1	2

¹ – w chwili rozpoczęcia terapii; *at the beginning of treatment*

K – kobiety; *women*

M – mężczyźni; *men*

b.d. – brak danych; *no data available*

Badania opierały się na założeniu, że obecność określonych wariantów genetycznych może wpływać na skuteczność terapii. Dlatego też, z ostatecznej analizy wyłączono trzy pacjentki, u których dawka początkowa była wyższa niż 400 mg lub nieznana (tabela 7). Zatem ostatecznie grupa chorych włączonych do badania liczyła 68 pacjentów, u których określono zarówno stopień zaawansowania choroby (M0 – jeden pacjent, M1 – 65 pacjentów, u dwóch pacjentów stopień zaawansowania choroby nie został określony) jak i lokalizację guza pierwotnego (tabela 8).

Tabela 8. *Table 8.* Lokalizacja guza pierwotnego w badanej grupie pacjentów. *Primary tumor location in a studied group of patients.*

Lokalizacja guza pierwotnego <i>Primary tumor location</i>	Liczba przypadków (%) <i>Number of cases (%)</i>
Żołądek (<i>stomach</i>)	24 (35)
Dwunastnica (<i>duodenum</i>)	2 (3)
Jelito cienkie (<i>small intestine</i>)	33 (49)
Odbytnica (<i>rectum</i>)	7 (10)
Przestrzeń zaotrzewnowa (<i>retroperitoneum</i>)	2 (3)

5.2. MATERIAŁ I ODCZYNNIKI

Materiał do badań genetycznych stanowił DNA wyizolowany z limfocytów krwi obwodowej pacjentów z GIST. Podczas wizyty kontrolnej pobierano od chorych po 5ml krwi na EDTA, a następnie przetrzymywano ją w temperaturze -80°C. Wszystkie odczynniki i roztwory wykorzystane do badań podano w tabelach 9 i 10.

Tabela 9. *Table 9.* Lista odczynników i zestawów wykorzystanych podczas pracy laboratoryjnej. *Reagents and kits used during laboratory procedures.*

Odczynnik <i>Reagent</i>		Firma <i>Company</i>	
Zestaw <i>Kit</i>	Clean-Up	A&A Biotechnology	
	ExTerminator		
	BigDye Terminator v3.1	Applied Biosystems	
GelRed Nucleic Acid Gel Stain		Biotium	
Polimerazy <i>Polymerases</i>	Taq	Thermo Fisher Scientific	
	DreamTaq		
Enzymy restrykcyjne <i>Restriction enzymes</i>	AvaI, BamHI, BstI, MboI, MseI, MvaI, Sau96I, SspI		
Bufory do reakcji enzymatycznych <i>Enzymatic reaction buffers</i>	10x Taq		
	10x DreamTaq		
	10x BamHI		
	10x G		
	10x R		
	10x Tango		
DNTPs			IBB PAN
MgCl ₂			
Startery / <i>Primers</i>		Merck	
Chloroform			
Izopropanol / <i>Isopropyl alcohol</i>		MP Biomedicals	
EDTA			
Fenol / <i>Phenol</i>			
Glicerol / <i>Glycerol</i>			
Kwas borowy / <i>Boric Acid</i>			
Proteinaza K / <i>Proteinase K</i>			
SDS			
TRIS			
Etanol / <i>Ethanol</i>			POCH
Agaroza / <i>Agarose</i>			Prona
Błękit bromofenolowy / <i>Bromophenol blue</i>		Sigma	
Bromek etydyny / <i>Ethidium bromide</i>			
KHCO ₃			
Ksylen cyjanu / <i>Xylene cyanol</i>			
NaCl			
NH ₄ Cl			
Marker wielkości / <i>DNA ladder</i>		Thermo Fisher Scientific	
ddH ₂ O		*	

* podwójnie destylowana woda, wykorzystana w doświadczeniach, była uzyskiwana w katedralnym laboratorium, przy użyciu systemu filtracji wody HLP5 firmy Hydrolab Polska. *Double-distilled water, utilized in experimentation, was obtained in our laboratory, with the use of water filtration system HLP5, made by Hydrolab Polska.*

Tabela 10. *Table 10.* Roztwory wykorzystane w badaniach. *Solutions used in the experimentation.*

Roztwór (objętość) <i>Solution (volume)</i>	Skład <i>Composition</i>
5x TBE (1000ml)	TRIS – 54g Kwas borowy / <i>Boric acid</i> – 27,5g 0,5M EDTA (pH=8) – 20ml ddH ₂ O – 980ml
5x RBC (500ml)	NH ₄ Cl – 20,73g KHCO ₃ – 2,3g 0,5M EDTA (pH=8) – 10ml ddH ₂ O – 500ml
Żel agarozowy (50ml) <i>Agarose gel (50ml)</i>	Agaroz / <i>Agarose</i> – 1g 0,5x TBE – 50ml Bromek etydyny / <i>Ethidium bromide</i> – 2,5μl lub / <i>or</i> GelRed – 2μl
NaCl/EDTA (1000ml)	NaCl – 4,37g 0,5M EDTA (pH=8) – 2ml ddH ₂ O – 1000ml
Bufor obciążający DNA (50ml) <i>DNA loading buffer (50ml)</i>	0,25% błękit bromofenolowy / <i>bromophenol blue</i> 0,25% cyjanol ksylenu / <i>xylene cyanol</i> 30% glycerol / <i>glycerol</i> w / <i>in</i> ddH ₂ O – 50ml

5.3. APARATURA

Tabela 11. *Table 11.* Aparatura wykorzystana w badaniach. *Laboratory equipment used in experimentation.*

Nazwa urządzenia <i>Device name</i>		Firma <i>Company</i>
3130 Genetic Analyser		Thermo Fisher Scientific
Termocykler GeneAmp PCR System 2700 <i>Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2700</i>		
Termocykler 2720 <i>Thermal Cycler 2720</i>		
Transilluminator GelDoc 2000		BIO-RAD
Zasilacz <i>Power supply unit</i>	Power Pac 300	
	Power Pac Basic	
Waga laboratoryjna MW-II <i>Laboratory scales MW-II</i>		CAS
Pipety / <i>Pipettes</i>		Eppendorf
Termomikser comfort 5355 <i>Thermomixer comfort 5355</i>		
Wirówka <i>Centrifuge</i>	5804 R	
	5810 R	
	Mini Spin	
System filtracji wody HLP5 <i>Water filtration system HLP5</i>		Hydrolab Polska
Vortex		IKA
Cieplarka 70°C Heraeus Function Line <i>Incubator 70°C Heraeus Function Line</i>		Thermo Scientific
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer		TK Biotech
BioDoc-It Imaging System		UVP
Chłodziarko-zamrażarka <i>Fridge-freezer</i>		Vestfrost

5.4. METODY

5.4.1. Izolacja DNA

W celu izolacji DNA rozmrażano krew obwodową pacjentów i niezwłocznie przystępowano do opisanej poniżej procedury:

A) Liza erytrocytów:

- 1) krew (5ml) mieszano z 1x RBC (5ml) i wirowano przez 10min, w 4°C, przy 4000rpm.;
- 2) po zwirowaniu zlewano supernatant z nad powstałego osadu. Następnie do próbek dodawano 5ml 1x RBC i silnie wstrząsano – aż do rozbicia osadu, po czym ponownie wirowano próbki (10min, 4°C, 4000rpm);
- 3) punkt nr 2 powtarzano kilka razy, aż do uzyskania przejrzystego supernatantu i jaśniejszego osadu.

B) Degradacja białek:

- 1) po ostatnim wirowaniu zlewano supernatant, dodawano 4ml NaCl/EDTA i silnie wstrząsano – aż do rozbicia osadu;
- 2) następnie dodawano 500μl 10% SDS i kilkakrotnie obracano próbki, po czym dodawano 12μl roztworu proteinazy K (20ng/ml) i ponownie obracano;
- 3) tak przygotowane próbki umieszczano w cieplarni o temperaturze wewnętrznej 37°C i pozostawiano na około 20 godzin.

C) Odbiałczanie:

- 1) po trawieniu dodawano do próbek 3ml fenolu i umieszczano je na wytrząsarce na 30min. Po tym czasie, wirowano przez 15min – 4°C, 4000rpm 4°C;
- 2) po zwirowaniu fazę wodną (górną) przenoszono do nowych próbek, dodawano 5ml chloroformu i umieszczano na wytrząsarce, na 30min. Następnie wirowano próbki – 10min, 4°C, 4000rpm;
- 3) punkt nr 2 powtarzano 3-4 razy.

D) Precypitacja i oczyszczanie DNA:

- 1) po ostatnim wirowaniu, przenoszono fazę wodną do nowych probówek, dodawano 5ml izopropanolu i umieszczano na około 20 godzin w zamrażarce o temperaturze -20°C ;
- 2) kolejnego dnia wirowano próbki przez 10min w temperaturze -4°C , 7000rpm, po czym z nad powstałego osadu (DNA) zlewano supernatant, a następnie dodawano 500 μl 70% etanolu;
- 3) punkt nr 2 powtarzano 2-3 razy, po czym probówki z osadem DNA, pozostawiano pod wyciągiem do wyschnięcia (kilkanaście godzin w temperaturze pokojowej);
- 4) po wyschnięciu osadu, dodawano do probówek 200 μl ddH₂O i ponownie pozostawiano na kilkanaście godzin, do rozpuszczenia osadu. Kolejnego dnia materiał był gotów do dalszych procedur.

5.4.2. Oznaczanie stężenia DNA

Przed przystąpieniem do badań genetycznych oznaczono stężenie DNA w każdej z próbek przy użyciu spektrofotometru NanoDrop1000. Po wykonaniu pomiarów, do roztworów, których stężenia przekraczały 60ng/ μl , dodano odpowiednią ilość ddH₂O tak, by uzyskać stężenie robocze wynoszące około 50ng/ μl . Materiał przechowywano w temperaturze 4°C .

5.4.3. Amplifikacja wybranych fragmentów

W celu oznaczenia wariantów genetycznych wykorzystano reakcję PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Reakcja opiera się na zastosowaniu termostabilnej polimerazy DNA, która w odpowiednich warunkach buforowych, amplifikuje ograniczony startem fragment DNA. W ramach niniejszej pracy wykorzystano dwa zestawy do amplifikacji. Pierwszy z wykorzystaniem polimerazy Taq, drugi – polimerazy DreamTaq. Składy mieszanin reakcyjnych i warunki temperaturowe dla obu rodzajów PCR, przedstawiono poniżej.

Tabela 12. *Table 12.* Skład mieszaniny reakcyjnej. *Reaction mix used in Taq based PCR.*

Odczynnik (stężenie) / <i>Component (concentration)</i>	Objętość / <i>Volume [ul]</i>
Polimeraza Taq / <i>Taq polymerase (5u/ul)</i>	0,1
Starter F / <i>F primer (10μM)</i>	1
Starter R / <i>R primer (10μM)</i>	1
dNTPs (5mM)	1
MgCl ₂	1,5
10x Bufor Taq / <i>10x Taq buffer</i>	2,5
ddH ₂ O	15,9
DNA (~50ng/ul)	2
Objętość całkowita / <i>Final volume</i>	25

F – forward; R – reverse (również w tabelach 13 i 14; *also in tables 13 and 14*)

Tabela 13. *Table 13.* Skład mieszaniny w reakcji PCR opartej na polimerazie DreamTaq. *Reaction mix used in DreamTaq based PCR.*

Odczynnik (stężenie) / <i>Component (concentration)</i>	Objętość / <i>Volume [ul]</i>
Polimeraza DreamTaq / <i>DreamTaq polymerase (5u/ul)</i>	0,1
Starter F / <i>F primer (10μM)</i>	1
Starter R / <i>R primer (10μM)</i>	1
dNTPs (5mM)	1
10x Bufor DreamTaq (zawierający Mg ²⁺) / <i>10x DreamTaq buffer (containing Mg²⁺)</i>	2,5
ddH ₂ O	18,4
DNA (~50ng/ul)	1
Objętość całkowita / <i>Final volume</i>	25

Amplifikacja dziesięciu różnych fragmentów DNA zawierających badane warianty genetyczne wymagała zastosowania 10 par starterów i 4 zestawów warunków, które przedstawiono w tabelach 14-18.

Tabela 14. *Table 14.* Warunki reakcji PCR dla polimorfizmów *CYP3A4* (rs2740574), *ABCG2* (rs2231142), *SCL22A4* (rs1050152) oraz *SLC22A5* (rs2631372). *PCR conditions for polymorphisms CYP3A4 (rs2740574), ABCG2 (rs2231142), SCL22A4 (rs1050152) and SLC22A5 (rs2631372).*

Etap PCR <i>PCR stage</i>	Temperatura (°C) <i>Temperature</i>	Czas (s) <i>Time</i>
Denaturacja wstępna / <i>Initial denaturation</i>	95	300
Amplifikacja (35 cykli) <i>Amplification (35 cycles)</i>	Denaturacja / <i>Denaturation</i>	95
	Przylączenie starterów <i>Primer annealing</i>	58
	Wydłużanie starterów <i>Primer extension</i>	72
Wydłużanie końcowe / <i>Final extension</i>	72	600
Zatrzymanie reakcji / <i>Reaction termination</i>	15	∞

Tabela 15. *Table 15.* Warunki reakcji PCR dla polimorfizmów *CYP3A5* (rs776746) i *CYP2D6* (rs1800716). *PCR conditions for polymorphisms CYP3A5 (rs776746) and CYP2D6 (rs1800716).*

Etap PCR PCR stage	Temperatura (°C) Temperature	Czas (s) Time
Denturacja wstępna / <i>Initial denaturation</i>	95	300
Amplifikacja (35 cykli) <i>Amplification (35 cycles)</i>	Denaturacja / <i>Denaturation</i>	95
	Przyłączanie starterów <i>Primer annealing</i>	57
	Wydłużanie starterów <i>Primer extension</i>	72
Wydłużanie końcowe / <i>Final extension</i>	72	600
Zatrzymanie reakcji / <i>Reaction termination</i>	15	∞

Tabela 16. *Table 16.* Warunki reakcji PCR dla polimorfizmu *CYP2C9* (rs28371674). *PCR conditions for polymorphism CYP2C9 (rs28371674).*

Etap PCR PCR stage	Temperatura (°C) Temperature	Czas (s) Time
Denturacja wstępna / <i>Initial denaturation</i>	95	300
Amplifikacja (35 cykli) <i>Amplification (35 cycles)</i>	Denaturacja / <i>Denaturation</i>	95
	Przyłączanie starterów <i>Primer annealing</i>	61
	Wydłużanie starterów <i>Primer extension</i>	72
Wydłużanie końcowe / <i>Final extension</i>	72	600
Zatrzymanie reakcji / <i>Reaction termination</i>	15	∞

Tabela 17. *Table 17.* Warunki reakcji PCR dla polimorfizmów *CYP2C19* (rs4244285), *CYP2C19* (rs4986893) oraz *ABCB1* (rs1045642). *PCR conditions for polymorphisms CYP2C19 (rs4244285), CYP2C19 (rs4986893) and ABCB1 (rs1045642).*

Etap PCR PCR stage	Temperatura (°C) Temperature	Czas (s) Time
Denturacja wstępna / <i>Initial denaturation</i>	95	300
Amplifikacja (35 cykli) <i>Amplification (35 cycles)</i>	Denaturacja / <i>Denaturation</i>	95
	Przyłączanie starterów <i>Primer annealing</i>	58
	Wydłużanie starterów <i>Primer extension</i>	72
Wydłużanie końcowe / <i>Final extension</i>	72	600
Zatrzymanie reakcji / <i>Reaction termination</i>	15	∞

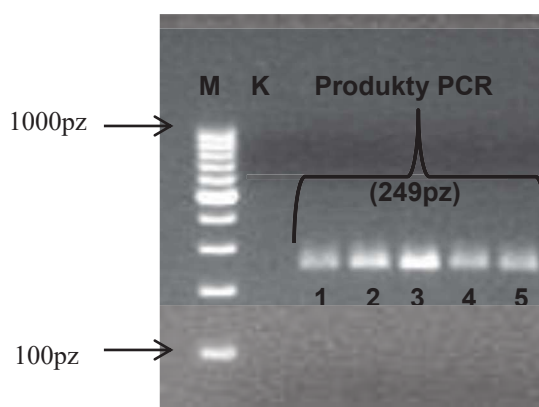
Tabela 18. Table 18. Startery zastosowane do amplifikacji badanych polimorfizmów. *Primers used in the amplification of analysed polymorphisms.*

Badany polimorfizm <i>Analysed polymorphism</i>	Para starterów <i>Primers pair</i>
<i>CYP3A4</i> (rs2740574)	F: CTGGGTTTGGGAAGGATGTGT R: TGAGGTATCATAAAACAACCAATCAA
<i>CYP3A5</i> (rs776746)	F: GGTCCAAACAGGGAAGAAATA R: CATGACTTAGTAGACAGATGA
<i>CYP2C9</i> (rs28371674)	F: CACTGGCTGAAAGAGCTAACAGAG R: GTGATATGGAGTAGGGTCACCCAC
<i>CYP2C19</i> (rs4244285)	F: CAACCAGAGCTTGGCATATTG R: CCTGTGCTGATCTCACTGGA
<i>CYP2C19</i> (rs4986893)	F: CCCTGTGATCCCACTTTCAT R: AAGACTCCAAAGTGCCTGGA
<i>CYP2D6</i> (rs1800716)	F: CCTTCGCCAACCACTCCG R: AAATCCTGCTCTTCCGAGGC
<i>ABCB1</i> (rs1045642)	F: TGTGCTGGTCCTGAAGTTGA R: GACAAAGGTGGAGCCTCAAG
<i>ABCG2</i> (rs2231142)	F: ATGATGTTGTGATGGGCACT R: TGGAAAGCAACCATTTTTGA
<i>SCL22A4</i> (rs1050152)	F: CCAACTTCACAAAATGATGCTC R: CCTTCCTAGCTATTCTTCCATGC
<i>SLC22A5</i> (rs2631372)	F: TTTGGTCTGGACAGAGGTCA R: ACCTGGCCAGCAGATTTTTA

5.4.4. Elektroforeza agarozowa

Elektroforeza agarozowa jest techniką pozwalającą na obrazowanie obecności m.in. fragmentów DNA w badanej próbce. Polega to na umieszczeniu mieszaniny DNA z buforem obciążającym na dnie studzienki w uprzednio przygotowanym żelu agarozowym, który zawiera barwnik fluorescencyjny. Całość zanurzona jest w roztworze do elektroforezy pomiędzy elektrodą ujemną a dodatnią. Do tak przygotowanego zestawu przykłada się prąd elektryczny, co powoduje migrację DNA w kierunku elektrody dodatniej w tempie zależnym od wielkości fragmentów, napięcia prądu i stężenia agarozu. Po zakończeniu umieszcza się żel w aparacie do obrazowania, zaopatrzonym w lampę UV. Barwnik zawarty w żelu świeci pod wpływem promieniowania UV, szczególnie intensywnie w miejscach, w których obecne jest DNA. Dzięki temu przy jednoczesnym zastosowaniu odpowiedniego markera wielkości, można sprawdzić czy badana próbka zawiera określonej długości fragmenty DNA. Marker wielkości to mieszanina różnej długości fragmentów DNA. Pozwala to na ocenę wielkości badanego fragmentu DNA. W niniejszej pracy stosowano 2% żel agarozowy, który umieszczano w roztworze TBE.

Do studzienek nakładano 12µl mieszaniny: 7µl produktu PCR i 5µl buforu obciążającego. Napięcie prądu w wykonywanych pomiarach wynosiło 120 V, a natężenie 400mA. W zależności od długości produktów reakcji PCR elektroforeza trwała od 20 do 60 minut. Stosowanym barwnikiem fluorescencyjnym był bromek etydyny lub GelRed. Zdjęcia i ich archiwizacja były wykonywane przy użyciu GelDoc 2000 lub BioDoc-It. Przykładowe zdjęcie żelu agarozowego, zawierającego produkty reakcji PCR, przedstawiono poniżej (ryc.7).



Ryc. 7. Wynik elektroforezy agarozowej, zawierającej produkt reakcji PCR, dla badanego polimorfizmu *CYP3A4*. Poziomymi strzałkami oznaczono skrajne fragmenty markera wielkości. M – marker wielkości; numerami 1-5 oznaczono produkty PCR dla kolejnych pacjentów (każdy prążek reprezentuje innego; w nawiasie podano wielkość produktu); K – kontrola negatywna; pz – pary zasad. *Image of agarose gel containing PCR product of the studied CYP3A4 polymorphism. Horizontal arrows indicate utmost DNA ladder fragments. M – DNA ladder; Produkty PCR – PCR product, each stripe represents different patient (product size in brackets); K – negative control; pz – base pairs.*

5.4.5. PCR-RFLP

Jedną z technik stosowanych w celu określenia genotypu badanych wariantów polimorficznych był PCR oparty na polimorfizmie długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP: *polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism*). Polega to na poddaniu produktu PCR trawieniu enzymem restrykcyjnym. Enzymy te rozpoznają krótkie, określone sekwencje nukleotydów i w obrębie tej sekwencji lub w ich bezpośrednim sąsiedztwie, przecinają obie nici DNA. Wariant genetyczny, mutacja lub polimorfizm, zmienia sekwencję DNA, co może skutkować pojawieniem się fragmentu rozpoznawanego przez restryktazę lub wręcz odwrotnie – może spowodować, że określone miejsce przestaje być rozpoznawane przez enzym. Odpowiednio zaprojektowane startery zapewniają uzyskanie produktu PCR, który zawiera sekwencję restryk-

cyjną dla wybranego enzymu. Produkt ten poddaje się następnie trawieniu restryktazą. W zależności od obecności badanego wariantu genetycznego produkt PCR jest trawiony lub nie przez enzym restrykcyjny. Uzyskane fragmenty poddawane są rozdzielowi w elektroforezie agarozowej, co pozwala na określenie wariantu genetycznego obecnego w badanej próbce. W niniejszej pracy PCR-RFLP użyto do wykrycia ośmiu polimorfizmów: *CYP3A5* (rs776746), *CYP2C9* (rs28371674), *CYP2C19* (rs4244285), *CYP2C19* (rs4986893), *CYP2D6* (rs1800716), *ABCB1* (rs1045642), *ABCG2* (rs2231142) oraz *SLC22A5* (rs2631372). 7µl produktu PCR wykorzystywano do potwierdzenia prawidłowości reakcji w elektroforezie agarozowej. Do pozostałej objętości (18µl) dodawano buforu zawierającego odpowiednią restryktazę (12µl). Uzyskaną mieszaninę umieszczano w termobloku,. Warunki reakcji i zastosowane odczynniki wyszczególniono w tabelach 19-21.

Tabela 19. *Table 19.* Enzymy restrykcyjne użyte do określenia badanych polimorfizmów. *Restriction enzymes used in detection of the studied polymorphisms.*

Badany polimorfizm <i>Polymorphism analysed</i>	Enzym restrykcyjny <i>Restriction enzyme</i>	Rozpoznawana sekwencja* <i>Recognized sequence*</i>
<i>CYP3A5</i> (rs776746)	SspI	5'... AATATT...3' 3'... TTATAA...5'
<i>CYP2C9</i> (rs28371674)	Sau96I	5'... GGNCC...3' 3'... CCNGG...5'
<i>CYP2C19</i> (rs4244285)	AvaI	5'... CYCGRG...3' 3'... GRGCYC...5'
<i>CYP2C19</i> (rs4986893)	BamHI	5'... GGATCC...3' 3'... CCTAGG...5'
<i>CYP2D6</i> (rs1800716)	MvaI	5'... CCWGG...3' 3'... GGWCC...5'
<i>ABCB1</i> (rs1045642)	MboI	5'... GATC...3' 3'... CTAG...5'
<i>ABCG2</i> (rs2231142)	MseI	5'... TTAA...3' 3'... AATT...5'
<i>SLC22A5</i> (rs2631372)	BsII	5'... CCNNNNNNNGG...3' 3'... GGNNNNNNNCC...5'

* **A, T, G, C** – odpowiednio: adenina, tymina, guanina, cytozyna; **N** – dowolna zasada azotowa; **R** – adenina lub guanina; **W** – adenina lub tymina; **Y** – cytozyna lub tymina. **Trójkątami** oznaczono miejsca cięcia.

* **A, T, G, C** – adenine, thymine, guanine, cytosine; **N** – any nitrogenous base; **R** – adenine or guanine; **W** – adenine or thymine; **Y** – cytosine or thymine. **Triangles** indicate restriction sites.

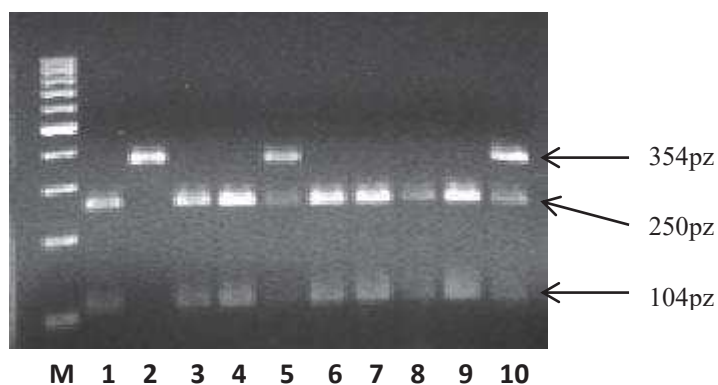
Tabela 20. *Table 20.* Skład mieszaniny reakcyjnej stosowany w trawieniu enzymatycznym. *Composition of reaction mix used in digestion with each of restriction enzymes.*

Składnik Component	Objętość (ul) Volume
Product PCR / <i>PCR product</i>	18
Enzym / <i>Enzyme</i>	0,5
Bufor / <i>Buffer</i>	3
ddH ₂ O	8,5
Objętość całkowita / <i>Final volume</i>	30

Tabela 21. *Table 21.* Warunki trawienia produktów PCR. *Conditions of digestion of PCR products.*

Enzym restrykcyjny Restriction enzyme	Temperatura (°C) Temperature	Czas (h) Time
SspI	37	16 – 20
Sau96I		
AvaI		
BamHI		
MboI		
MvaI		
BsII	55	
MseI	65	

Po trawieniu enzymem restrykcyjnym mieszaninę poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu. Na podstawie otrzymanych zdjęć określano warianty genetyczne w poszczególnych próbkach. Techniki PCR-RFLP użyto do wykrycia następujących polimorfizmów: *CYP3A5* (rs776746), *CYP2C9* (rs28371674), *CYP2C19* (rs4244285), *CYP2C19* (rs4986893), *CYP2D6* (rs1800716), *ABCB1* (rs1045642), *ABCG2* (rs2231142) oraz *SLC22A5* (rs2631372). Poniżej przedstawiono przykładowe zdjęcie żelu.



Ryc. 8. *Fig. 8.* Zdjęcie żelu zawierającego produkty trawienia DNA enzymem MvaI, dla polimorfizmu *CYP2D6* (rs1800716). M – marker wielkości; numerami 1-10 oznaczono kolejnych pacjentów. Strzałki wskazują na fragmenty DNA o określonej długości. *Image of gel containing DNA digested with MvaI enzyme, for CYP2D6 (rs1800716) polymorphism. M – DNA ladder; numbers 1-10 stand for consecutive patients. Arrows indicate DNA fragments of specified length.*

W celu potwierdzenia poprawności wyników uzyskanych techniką PCR-RFLP, kilka do kilkunastu próbek dla każdego badanego polimorfizmu poddano sekwencjonowaniu. Na szczególną uwagę zasługiwały homozygoty, u których z powodu braku kontrolnego miejsca cięcia dla restryktazy, wynikiem trawienia był niezmienny produkt reakcji PCR. W żadnym przebadanym obydwoma technikami przypadku, nie stwierdzono rozbieżności wyników.

5.4.6. Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie bezpośrednio działa analogicznie do reakcji PCR, ale z pewnymi różnicami. Po pierwsze matrycą w reakcji nie jest genomowe DNA a produkt reakcji PCR zawierający badany fragment DNA. Po drugie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się tylko jeden rodzaj startera (F lub R). Po trzecie oprócz zwykłych nukleotydów w reakcji obecne są również dideoksynukleotydy wyznakowane fluorescencyjnie. Ich wbudowanie przez polimerazę do nowopowstającej nici uniemożliwia przyłączanie kolejnych nukleotydów, co prowadzi do zatrzymania wydłużania. Dzięki temu w reakcji powstaje mieszanina fragmentów DNA o różnej długości, z których każdy zakończony jest wyznakowanym nukleotydem. Następnie mieszaninę umieszcza się w sekwenatorze, który przeprowadza elektroforezę kapilarną. Począwszy od najkrótszego, fragmenty przemieszczają się przez detektor, który odczytuje sygnały z wyznakowanych nukleotydów. W ten sposób otrzymuje się dokładną sekwencję badanego fragmentu DNA. W ramach niniejszej pracy wykorzystano ją do przebadania polimorfizmów *CYP3A4* (rs2740574) oraz *SCL22A4* (rs1050152). Ponadto, sekwencjonowanie wykorzystano do sprawdzenia poprawność części wyników otrzymanych techniką PCR-RFLP. Do sekwencjonowania wykorzystano produkty reakcji PCR, które oczyszczano zestawem Clean-Up zgodnie z protokołem producenta. Następnie przeprowadzano reakcję sekwencjonowania z zastosowaniem zestawu BigDye Terminator v3.1. Produkty reakcji oczyszczano przy użyciu zestawu ExTerminator, w oparciu o dołączony protokół. Po denaturacji termicznej (3min w 95°C), próbki przetrzymywano w temperaturze -20°C, do czasu rozdziału elektroforetycznego. Analiza wyników sekwencjonowania wykonywana była przy użyciu programu Sequencher 4.10.1. Składniki i warunki reakcji sekwencyjnej zamieszczono w tabelach 22 i 23. Przykładowe elektroforegramy, stanowiące cyfrowy zapis wyniku sekwencjonowania znajdują się poniżej tabel (ryc. 9).

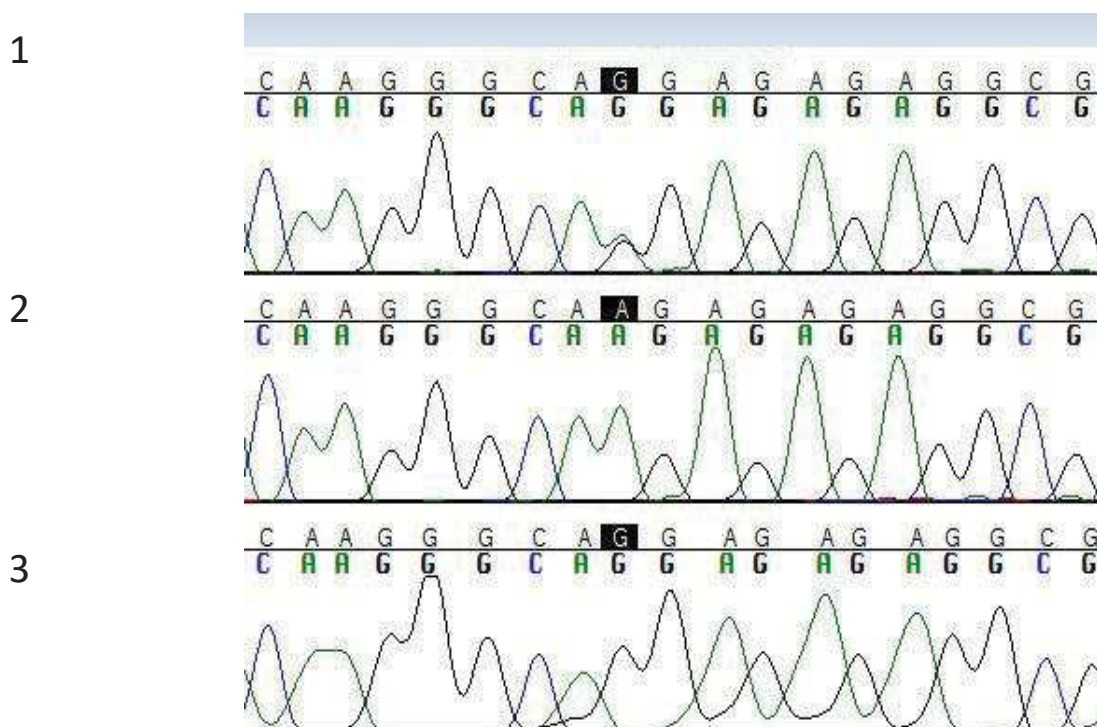
Tabela 22. *Table 22.* Skład mieszaniny w reakcji sekwencyjnej. *Components of sequencing reaction mix.*

Składnik Component	Objętość (ul) Volume
BigDye	1
Starter / <i>Primer</i>	2
Bufor / <i>Buffer</i>	4
ddH ₂ O	11
Produkt PCR / <i>PCR product</i>	2
Objętość całkowita / <i>Final volume</i>	20

Tabela 23. *Table 23.* Warunki reakcji sekwencyjnej. *Sequencing reaction conditions.*

Etap reakcji Reaction stage	Temperatura (°C) Temperature	Czas (s) Time
Denturacja wstępna / <i>Initial denaturation</i>	96	60
Amplifikacja (25 cykli) <i>Amplification (25 cycles)</i>	Denaturacja / <i>Denaturation</i>	96
	Przyłączanie starterów <i>Primer annealing</i>	50
	Wydłużanie starterów <i>Primer extension</i>	60
Zatrzymanie reakcji / <i>Reaction termination</i>	15	∞

1) Polimorfizm *CYP3A4* (rs2740574)



Ryc. 9. *Fig. 9.* Elektroforegramy sekwencjonowania DNA dla polimorfizmu *CYP3A4* (rs2740574). Numerami oznaczono próbki od kolejnych pacjentów. Sygnały pochodzące od różnych nukleotydów oznaczono odrębnymi kolorami. Obecność danego sygnału pod symbolem literowym zasady azotowej, określa wariant genetyczny występujący w tym miejscu. Jedyne widoczne różnice między elektroforegramami, występują w oznaczonym na czarno miejscu polimorfizmu. W przypadku pacjenta nr 1 widać dwa równorzędne sygnały: A oraz G, co oznacza heterozygotę. U pacjenta nr 2, obecny jest jedynie sygnał A, oznaczający homozygotę AA, natomiast u pacjenta nr 3, sygnał G, oznaczający homozygotę GG. W analogiczny sposób określono warianty genetyczne, obecne u pozostałych pacjentów. *Electropherograms of DNA sequencing for polymorphism CYP3A4 (rs2740574). Numbers stand for samples of consecutive patients. Signals from different nucleotides are marked with different colors. Presence of a specific signal under the nitrogenous base letter determines genetic variant. The only difference between shown electropherograms is present under the black square marked letter meaning polymorphic site. In case 1, two signals are present: A and G standing for a heterozygote. In case 2, there is only one signal: A standing for an AA homozygote and in case 3: G signal standing for a GG homozygote. All other cases were analyzed in the same way.*

5.4.7. Analiza statystyczna

W celu określenia wpływu badanych polimorfizmów na wolny od progresji czas przeżycia chorych, dla nosicieli danego wariantu wykreślono krzywe przeżycia Kaplana-Meiera. Jednocześnie sprawdzano istotność różnic pomiędzy tymi krzywymi w oparciu o test log-rank. Analizę zgodności uzyskanych rozkładów genotypów z równowagą Hardy-Weinberga przeprowadzono w oparciu o test χ^2 .

Obliczenia statystyczne zostały wykonane przy użyciu programu STATISTICA for Windows, wersja 10 (StatSoft Polska Sp. z o.o.). Za statystycznie istotną przyjęto wartość $p < 0,05$.

6. WYNIKI

6.1.1 Rozkład genotypów

W badanej grupie 68 pacjentów przeprowadzono genotypowanie przy użyciu technik PCR-RFLP oraz sekwencjonowania DNA. U trzech chorych, ze względu na małą ilość DNA, nie przeprowadzono analizy wszystkich wariantów polimorficznych. Wyniki genotypowania przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 24. *Table 24.* Wyniki genotypowania w badanej grupie pacjentów. *Genotyping results in the studied group of patients.*

Polimorfizm <i>Polymorphism</i>	Liczba pacjentów (n=) <i>Number of patients</i>	Poszczególne genotypy (częstość %) <i>Particular genotypes (frequency)</i>
<i>CYP3A4</i> (rs2740574)	66	AA – 63 (95,5) AG – 2 (3) GG – 1 (1,5)
<i>CYP3A5</i> (rs776746)	68	GG – 62 (91,2) AG – 6 (8,8)
<i>CYP2C9</i> (rs28371674)	68	CC – 53 (77,9) CT – 15 (22,1)
<i>CYP2C19</i> (rs4244285)	67	GG – 48 (71,6) AG – 19 (28,4)
<i>CYP2C19</i> (rs4986893)	66	GG – 66 (100)
<i>CYP2D6</i> (rs1800716)	68	GG – 45 (66,2) AG – 18 (26,5) AA – 5 (7,3)
<i>ABCB1</i> (rs1045642)	68	TT – 21 (30,9) CT – 30 (44,1) CC – 17 (25)
<i>ABCG2</i> (rs2231142)	65	CC – 46 (70,8) AC – 18 (27,7) AA – 1 (1,5)
<i>SCL22A4</i> (rs1050152)	66	CC – 25 (37,9) CT – 33 (50) TT – 8 (12,1)
<i>SLC22A5</i> (rs2631372)	66	GG – 31 (47) CG – 28 (42,4) CC – 7 (10,6)

Za wyjątkiem polimorfizmu *CYP3A4* (rs2740574), rozkłady genotypów pozostałych polimorfizmów były zgodne z zasadą równowagi Hardy-Weinberga.

6.1.2 Znaczniki lokalizacji guza pierwotnego

Przed przystąpieniem do analizy wpływu badanych polimorfizmów na efekt leczenia, sprawdzono zależność między lokalizacją guza pierwotnego, a skutecznością terapii, wyrażoną czasem upływającym od rozpoczęcia terapii do progresji choroby. Okazało się, że czas ten jest istotnie dłuższy ($p=0,022$; wykres w załączniku) u pacjentów z guzami żołądka niż u chorych z guzami jelita cienkiego lub dwunastnicy. Inne lokalizacje nie były dość licznie reprezentowane, by przeprowadzić podobne porównania. Otrzymany wynik oznaczał jednak, że pacjentów należy podzielić na dodatkowe podgrupy, zależne od lokalizacji guza pierwotnego (tabela 8). Tylko grupa pacjentów z guzami jelita cienkiego lub dwunastnicy (35 przypadków), okazała się wystarczająco liczna do przeprowadzenia wiarygodnej analizy. Omawiane dalej wyniki dotyczą zatem tylko tej grupy chorych.

6.2. WYNIKI ANALIZY STATYSTYCZNEJ

W celu określenia związku badanych polimorfizmów ze skutecznością leczenia imatinibem chorych z GIST przeprowadzono dwa rodzaje analizy: jedno- i wieloczynnikową. W obu przypadkach oceniano wpływ danych polimorfizmów na czas, jaki upłynął od rozpoczęcia terapii do progresji choroby. Ocena ta polegała na obliczeniu i wykreśleniu krzywych przeżycia Kaplana-Meiera dla nosicieli danego genotypu bądź układu genotypów. Następnie porównywano te krzywe przy zastosowaniu testu równości log-rank. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p<0,05$. Test log-rank pozwala na porównanie dwóch grup. W przypadku niektórych badanych polimorfizmów zidentyfikowano trzy warianty genetyczne. W takich sytuacjach grupowano heterozygoty z jednym z wariantów homozygotycznych. Podziału tego dokonywano na podstawie analizy wcześniej opublikowanych doniesień naukowych. Szczegółowe wyniki badań przedstawiono w dwóch, znajdujących się poniżej podrozdziałach.

6.2.1. Wyniki analizy jednoczynnikowej

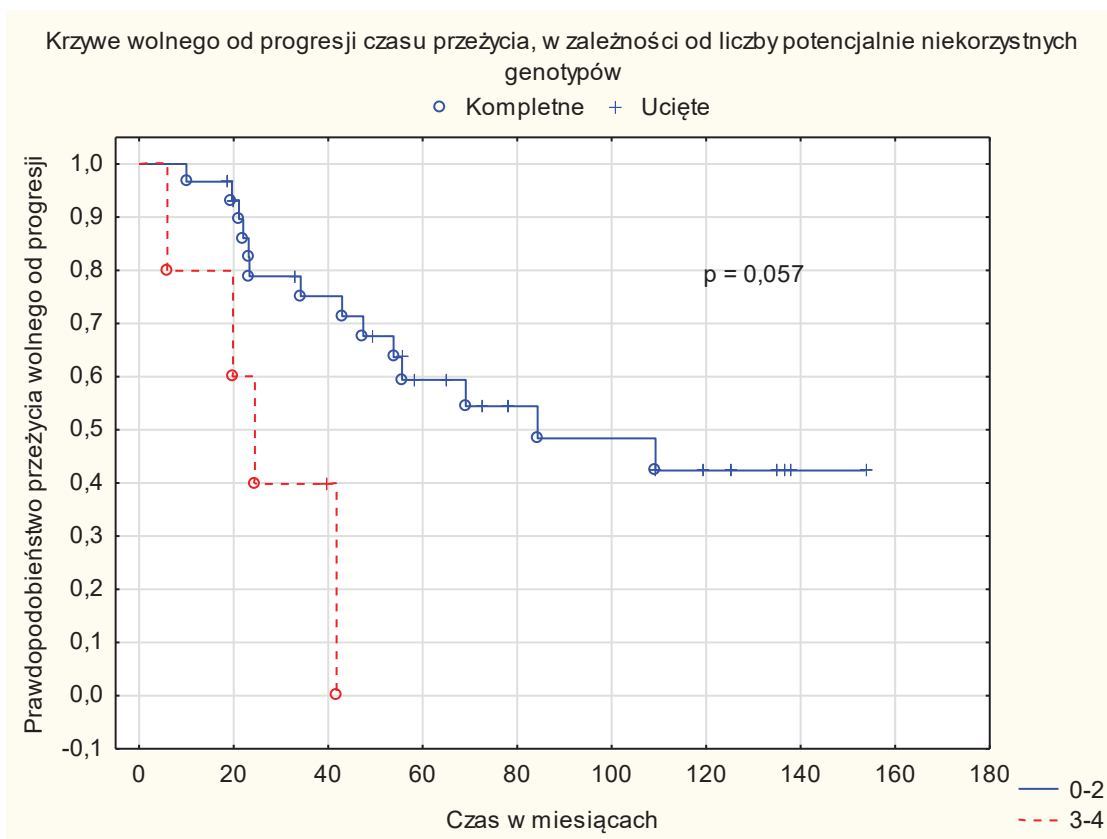
W analizie jednoczynnikowej przebadano każdy polimorfizm z osobna, jako potencjalny czynnik ryzyka, który może wpływać na różnice w wolnym od progresji czasie przeżycia pacjentów z GIST. W przypadku czterech polimorfizmów *CYP3A4* (rs2740574), *CYP3A5* (rs776746), *ABCG2* (rs2231142) oraz *SLC22A5* (rs2631372), ze względu na zbyt małą liczbę poszczególnych podgrup, nie było możliwości wykreślenia wiarygodnych krzywych przeżycia. Natomiast genotypowanie polimorfizmu *CYP2C19* (rs4986893) wykazało obecność genotypu *GG* u wszystkich pacjentów. Wykresy krzywych przeżycia dla pozostałych polimorfizmów znajdują się w załączniku.

Analiza jednoczynnikowa przeprowadzona dla pięciu z dziesięciu badanych polimorfizmów nie wykazała wpływu któregośkolwiek z nich na wolny od progresji czas przeżycia pacjentów z GIST poddanych terapii imatynibem. W przypadku pięciu pozostałych polimorfizmów analiza nie była możliwa z uwagi na zbyt małą liczbę nosicieli rzadszych genotypów. Wyniki testów log-rank przedstawiono w tabeli 25.

6.2.2. Wyniki analizy wieloczynnikowej

W analizie wieloczynnikowej poddano badaniu wpływ układu genotypów na skuteczność terapii. Na podstawie przeglądu literatury wytypowano warianty genetyczne, które mogą potencjalnie obniżać efektywność leczenia imatynibem. Następnie w oparciu o genotyp podzielono pacjentów na odpowiednie grupy. Z analizy wyłączono polimorfizmy, których na podstawie danych literaturowych nie powiązano w istotny sposób z profilem farmakokinetycznym imatynibu. Były to geny, których produkty są tylko w niewielkim stopniu zaangażowane w metabolizm leku: *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* oraz *CYP3A5*. Ostatecznie analizę statystyczną przeprowadzono dla pięciu polimorfizmów: genu *CYP3A4* kodującego enzym odpowiedzialny za metabolizm imatynibu oraz genów *ABCB1*, *ABCG2*, *SCL22A4* i *SLC22A5*, których produkty białkowe biorą udział w transporcie imatynibu. Genotypy, które w ramach tych polimorfizmów mogą negatywnie oddziaływać na skuteczność terapii, to: *CYP3A4* -392 *AG* lub *GG*, *ABCB1* 3435 *TT*, *ABCG2* 421 *AC* lub *CC*, *SCL22A4* 1672 *TT* i *SLC22A5* -2087 *CC*. W oparciu o obecność wymienionych wariantów pacjentów podzielono na dwie grupy. W pierwszej

znaleźli się chorzy będący nosicielami dwóch lub mniej, potencjalnie niekorzystnych genotypów. Drugą grupę utworzyli pacjenci, u których wykryto co najmniej trzy takie genotypy. Wyniki analizy zamieszczono poniżej.



Ryc. 10. Fig. 10. Wykres krzywych przeżycia w analizie wieloczynnikowej. W prawym górnym rogu zamieszczono wynik testu log-rank. Oznaczenia 0-2 oraz 3-4 to liczby potencjalnie niekorzystnych genotypów, obecnych w danej grupie (*CYP3A4* -392 AG lub GG, *ABCB1* 3435 TT, *ABCG2* 421 AC lub CC, *SCL22A4* 1672 TT i *SLC22A5* -2087 CC). *Graphic presentation of survival curves in multivariate analysis. Result of the log-rank test placed in the top right corner. 0-2 or 3-4 indicate number of potentially unfavourable genotypes, present in the given group (*CYP3A4* -392 AG lub GG, *ABCB1* 3435 TT, *ABCG2* 421 AC lub CC, *SCL22A4* 1672 TT i *SLC22A5* -2087 CC).*

Wynik testu log-rank ($p=0,057$), porównującego krzywe przeżycia nosicieli dwóch lub mniej potencjalnie niekorzystnych genotypów z nosicielami co najmniej trzech takich genotypów, wskazuje na możliwy wpływ obecności przynajmniej trzech niekorzystnych wariantów na skrócenie wolnego od progresji czasu przeżycia chorych z GIST. Wyniki przeprowadzonych analiz, zamieszczono w tabeli 25.

Tabela 25. *Table 25.* Wyniki analizy statystycznej oceniającej wpływ badanych polimorfizmów na wolny od progresji czas przeżycia pacjentów z GIST, leczonych imatynibem. *Statistical analysis results of the influence of the chosen polymorphisms on progression free survival of GIST patients.*

	Polimorfizm Polymorphism	Liczba pacjentów (n=) Number of patients	Wartość P* P value*
Analiza jedno- czynnikowa Univariate analysis	<i>CYP3A4</i> (rs2740574)	34	**
	<i>CYP3A5</i> (rs776746)	35	**
	<i>CYP2C9</i> (rs28371674)	35	0,38
	<i>CYP2C19</i> (rs4244285)	35	0,87
	<i>CYP2C19</i> (rs4986893)	34	**
	<i>CYP2D6</i> (rs1800716)	35	0,44
	<i>ABCB1</i> (rs1045642)	35	0,98
	<i>ABCG2</i> (rs2231142)	33	**
	<i>SCL22A4</i> (rs1050152)	34	0,98
	<i>SLC22A5</i> (rs2631372)	34	**
Analiza wieloczynnikowa Multivariate analysis		34	0,057

* wynik testu log-rank; *log-rank test result*

** analiza statystyczna nie została przeprowadzona w związku z niewystarczającą frekwencją rzadszych alleli; *statistical analysis was not performed, due to insufficient frequency of minor alleles*

7. DYSKUSJA

GIST to najczęstsze guzy pochodzenia mezenchymalnego zlokalizowane w ścianie przewodu pokarmowego na całej jego długości. U podstaw rozwoju blisko 80% nowotworów podścieliskowych przewodu pokarmowego leżą mutacje genu *KIT* [25]. Mutacje te powodują zmiany w budowie receptora, prowadzące do jego konstytutywnej aktywacji i w efekcie do niekontrolowanej proliferacji komórek. Zdecydowaną ich większość wykrywa się w eksonie 11 genu *KIT*, znacznie rzadziej w eksonie 9, 13, 17 tego genu lub w genie *PDGFRA* [107]. Podstawową metodą leczenia jest resekcja zmian, jednak w przypadku nieoperacyjnych/rozsianych GIST stosuje się terapię z wykorzystaniem imatynibu [18]. Jest to selektywny inhibitor kinaz tyrozynowych, do których należą receptory *KIT* i *PDGFRA*. Jego działanie opiera się na kompetycyjnym względem ATP wiązaniu do części enzymatycznej receptora, co uniemożliwia fosforylację substratu i w efekcie hamuje ścieżkę sygnałową, prowadzącą do proliferacji [136]. Większość poddanych terapii pacjentów prezentuje przynajmniej częściową odpowiedź na leczenie lub pozostaje w stadium choroby ustabilizowanej [11]. Niestety u większości chorych dochodzi po pewnym czasie do progresji choroby, wynikającej z pojawienia się mutacji wtórnych.

Uważa się, że jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie guzów wtórnie opornych na leczenie, jest zmiana w profilu farmakokinetycznym imatynibu, wiążąca się na przykład ze zwiększeniem tempa usuwania leku z ustroju [171]. Innymi słowy, długotrwała ekspozycja komórek nowotworowych na działanie imatynibu o stężeniu niższym niż wynikałoby z wielkości przypisanej dawki, może przyczyniać się do szybszego wystąpienia progresji. Okazuje się, że okres czasu upływającego od rozpoczęcia terapii do progresji choroby może się bardzo różnić, nawet pomiędzy pacjentami, u których wykryto podobne mutacje w guzach pierwotnych. Jednym z czynników mogących przyczyniać się do istnienia tego zjawiska są właśnie różnice w profilu farmakokinetycznym imatynibu, wynikające z indywidualnej dla każdego pacjenta aktywności metabolicznej enzymów, które biorą udział w biotransformacji leku. Metabolizm imatynibu odbywa się głównie w wątrobie, przy udziale izoenzymów cytochromu P450, a przede wszystkim CYP3A4. W mniejszym stopniu zaangażowane są w ten proces także enzymy CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 oraz CYP3A5. Imatynib może być także substratem dla transporterów z rodzin ABC (*ABCB1*, *ABCG2*) i SLC (*OCTN1*,

OCTN2), które są białkami transbłonowymi, odpowiedzialnymi między innymi za transport ksenobiotyków. W ramach genów kodujących wszystkie wymienione białka zidentyfikowano szereg wariantów polimorficznych, mogących wpływać na ich aktywność. Oznacza to, że aktywność ta może być różna u pacjentów będących nosicielami różnych wariantów. To z kolei może być przyczyną innego tempa metabolizmu imatynibu u nosicieli danego polimorfizmu, a tym samym powodować, np. zmniejszenie stałego poziomu leku u chorego, mimo otrzymywania standardowej dawki. W jednym z badań zaobserwowano, że indukcja tempa metabolizmu imatynibu fenytoiną spowodowała drastyczny spadek stężenia leku u chorego, co było przyczyną niepowodzenia terapii [42]. Jest zatem możliwe, że również uwarunkowania genetyczne mogą przełożyć się na skuteczność leczenia. Dlatego celem niniejszej pracy było określenie wpływu wybranych polimorfizmów genów, których produkty zaangażowane są w metabolizm imatynibu, na efekt leczenia chorych z GIST. Skuteczność terapii wyrażona była czasem, jaki upłynął od rozpoczęcia terapii do progresji choroby.

Chorych włączonych do badania, podzielono na podgrupy w zależności od rodzaju mutacji w guzie pierwotnym, z uwagi na związek tych zmian genetycznych z odpowiedzią na leczenie. Tylko grupa pacjentów z guzami, w których wykryto mutację eksonu 11 genu *KIT*, okazała się na tyle liczna (68 osób), aby móc uwzględnić ją w analizie statystycznej. Od chorych pobrano po 5ml krwi obwodowej w celu wyizolowania DNA stanowiącego materiał do badań genetycznych. Genotypowanie wariantów polimorficznych przeprowadzono z wykorzystaniem techniki PCR-RFLP oraz sekwencjonowania bezpośredniego DNA metodą Sangera.

W pierwszej kolejności zbadano polimorfizmy genów kodujących enzymy biorące udział w metabolizmie imatynibu. Jednym z nich jest *CYP2C9*, czyli najpowszechniejszy przedstawiciel rodziny *CYP2C* we frakcji wątrobowej. Polimorfizm *CYP2C9*2* (430C>T; rs28371674) występuje w obrębie kodonu 144 i powoduje zastąpienie arginy cysteiną, co może prowadzić do obniżenia aktywności enzymu względem części substratów [135]. Wykazano między innymi, że w grupie osób przyjmujących klopido-grel, homozygoty *TT* prezentowały istotnie niższe stężenie aktywnego metabolitu tego leku i wiążącą się z tym słabszą odpowiedź niż nosiciele pozostałych wariantów (*CC+CT*) [13]. W innym badaniu wykazano, że nosiciele przynajmniej jednego allelu T wymagają niższej dawki warfaryny w porównaniu do osób przyjmujących ten lek i będących homozygotami WT [49]. W niniejszej pracy nie stwierdzono związku tego po-

limorfizmu z efektem leczenia imatynibem chorych z GIST ($p=0,38$). Częstość wykrytych alleli wynosiła: *C*-89%, *T*-11% i była zbliżona do wcześniej opisanych w literaturze częstości charakterystycznych dla populacji kaukaskiej [13]. Rozkład genotypów był zgodny z równowagą Hardy-Weinberga ($p=0,6$).

Następnym badanym polimorfizmem był *CYP2C19*2* (681G>A; rs4244285). Jego obecność jest przyczyną defektu składania i tym samym powstawania skróconego, nieaktywnego enzymu [33]. Podobnie jak w przypadku *CYP2C9*2*, powoduje to obniżenie stężenia aktywnego metabolitu klopidogrelu i w konsekwencji słabszą odpowiedź na leczenie, z tą różnicą, że efekt był już widoczny u heterozygot [13]. Wyniki te potwierdziły się w badaniu przeprowadzonym wśród otrzymujących klopidogrel pacjentów z chorobami wieńcowymi. Okazało się, że nosiciele przynajmniej jednego allelu *A* wymagają istotnie wyższej dawki leku, w porównaniu z homozygotami WT [104]. Ponadto obecność tego wariantu wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych podczas przyjmowania klopidogrelu [151]. Analiza statystyczna przeprowadzona w ramach niniejszej pracy nie wykazała związku pomiędzy poszczególnymi wariantami polimorficznymi tego genu, a efektem leczenia imatynibem w badanej grupie chorych ($p=0,87$). Częstość wykrytych alleli wynosiła: *G*-86%, *A*-14% i była zgodna z wcześniej obserwowaną częstością w populacji kaukaskiej [13, 47]. Rozkład genotypów był zgodny z równowagą Hardy-Weinberga ($p=0,39$).

Drugim wariantem polimorficznym tego genu analizowanym w niniejszym badaniu był *CYP2C19*3* (636G>A; rs4986893). Wariant ten prowadzi do utworzenia kodonu stop i braku funkcjonalnego produktu białkowego [32]. Jego znaczenie kliniczne wydaje się być zbliżone do wariantu *CYP2C19*2* i wiąże się również ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów przyjmujących klopidogrel [118, 151]. Ponadto, obecność jednego z tych wariantów w układzie homozygotycznym lub obu w układzie heterozygotycznym określana jest jako fenotyp słabego metabolizmu i wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka wątrobowokomórkowego u nosicieli wirusa HCV z marskością wątroby [20]. Ocena wpływu tego wariantu na skuteczność leczenia imatynibem w badanej grupie chorych z GIST była niemożliwa ze względu na fakt, że u wszystkich osób stwierdzono genotyp *GG*. Uzyskany wynik nie jest zaskoczeniem z uwagi na fakt, iż frekwencja tego wariantu w populacji kaukaskiej jest bardzo niska [56, 118].

Kolejnym badanym polimorfizmem był wariant *CYP2D6*4* (1846G>A; rs1800716), powodujący błędne składania genu, co prowadzi do powstawania skróconego, nieaktywnego białka [55]. Wyniki wcześniejszych badań wykazały istotnie większą frekwencję tego wariantu u nieodpowiadających na leczenie kolchicyną chorych na rodzinną gorączkę śródziemnomorską w porównaniu do osób, które odpowiedziały na terapię [175]. Wariant ten wiąże się także z istotnie niższym stężeniem aktywnego metabolitu tamoksyfenu u przyjmujących ten lek pacjentek z rakiem piersi [74]. Mimo to okazało się, że nie ma on wpływu na ogólne przeżycie pacjentek [119]. W niniejszej grupie pacjentów z GIST, podobnie jak w przypadku poprzednich wariantów genetycznych, nie wykazano wpływu wariantów *CYP2D6*4* na wolny od progresji czas przeżycia ($p=0,44$). Obecność nawet jednego allelu *A* wiąże się z niższym poziomem aktywnego metabolitu tamoksyfenu [74], dlatego też w przeprowadzonej analizie porównano homozygoty WT (*GG*) z nosicielami pozostałych wariantów (*AA+AG*). By upewnić się, że inne kombinacje genotypów nie wpływają na efekty leczenia, przeprowadzono analizy porównujące: *AA* vs *AG+GG* oraz *AA* vs *AG* vs *GG*. Uzyskane wyniki nie wykazały związku pomiędzy poszczególnymi genotypami a skutecznością terapii. Częstość wykrytych alleli wynosiła: *G*-79%, *A*-21% i była zgodna z wynikami uzyskanymi przez inne zespoły badawcze [140]. Rozkład genotypów był zgodny z równowagą Hardy-Weinberga ($p=0,3$).

Przedostatnim przebadanym polimorfizmem, dotyczącym genów cytochromu P450, był *CYP3A5*3C* (6986A>G; rs776746). Powoduje on alternatywne składanie i skrócenie produktu białkowego w skutek pojawienia się kodonu stop, czego efektem jest brak funkcjonalnego enzymu [83]. Okazało się, że poszczególne warianty genetyczne mają wpływ na wielkość dawki koniecznej do uzyskania zamierzonego stężenia leku takrolimus u pacjentów po przeszczepie nerki [64]. Inne badanie przeprowadzone w grupie chorych z CML leczonych imatynibem wykazało, że obecność tego wariantu w układzie homozygotycznym (*GG*) jest związana z gorszą odpowiedzią na terapię [8]. Sprzeczne wyniki otrzymano w innym badaniu przeprowadzonym również wśród pacjentów z CML poddanych terapii imatynibem. W badaniu tym to pacjenci będący homozygotami *AA* charakteryzowali się gorszą odpowiedzią na leczenie [76]. W niniejszej pracy, z uwagi na zbyt niską frekwencję rzadszego allelu, ocena związku poszczególnych wariantów genetycznych *CYP3A5*3C* z czasem upływającym od rozpoczęcia terapii do progresji choroby nie była możliwa. Frekwencja alleli wyniosła *G*-96%, *A*-4% i była

zgodna z wynikami uprzednio opublikowanych badań [76], a rozkład genotypów był zgodny z równowagą Hardy-Weinberga ($p=0,93$). Warto zauważyć, że allel *A* jest rzadki w populacji kaukaskiej. W związku z czym, z uwagi na stosunkowo niską liczebność badanej grupy, zaobserwowano jedynie sześć heterozygot i żadnej homozygoty *AA*. Trudno zatem na podstawie przedstawionej analizy wyciągnąć jednoznaczne wnioski odnośnie znaczenia tego wariantu. Konieczne byłoby przeprowadzenie analogicznych badań w parokrotnie liczniejszej grupie chorych, w której można byłoby zidentyfikować przynajmniej kilka homozygot *AA*.

Żaden z opisanych powyżej polimorfizmów nie okazał się być związany ze skutecznością leczenia chorych z GIST z wykorzystaniem imatynibu. Można się jednak było tego spodziewać z uwagi na fakt, iż przedstawiciele rodziny CYP2 nie odgrywają kluczowej roli w metabolizmie leku, natomiast CYP3A5 występuje u niemal wszystkich pacjentów w nieaktywnej postaci. Zatem z punktu widzenia metabolizmu imatynibu, najważniejszy z badanych polimorfizmów, dotyczył genu *CYP3A4*, którego produkt jest głównym enzymem odpowiedzialnym za biotransformację leku [126]. Wykazano, że obecność wariantu *CYP3A4*1B* (-392A>G; rs2740574) może powodować wzrost aktywności transkrypcyjnej genu, a tym samym ekspresji enzymu [1]. Mogłoby to przełożyć się na wzrost tempa metabolizmu substratów i w konsekwencji ich szybsze usuwanie z ustroju. Taki właśnie mechanizm zdaje się być przyczyną obniżonego stężenia leku takrolimus u nosicieli przynajmniej jednego allelu *G* względem homozygot *AA* w grupie osób po przeszczepie nerki [64]. Takrolimus, podobnie jak imatynib, jest metabolizowany przez CYP3A4. Dlatego też u pacjentów z GIST leczonych imatynibem i będących nosicielami allelu *G* również mogłoby dojść do obniżenia stężenia leku i tym samym zmniejszenia skuteczności terapii. Takie badanie przeprowadzono wśród przyjmujących imatynib pacjentów z GIST, jednak z uwagi na zbyt niską frekwencję allelu *G*, nie można było dokonać wiarygodnej oceny znaczenia tego wariantu [127]. Niestety również w ramach niniejszej pracy określenie wpływu tego polimorfizmu na czas upływający od rozpoczęcia terapii do progresji choroby, okazało się niemożliwe z uwagi na zbyt niską częstość występowania rzadszego allelu. Allel ten został jednak ujęty w analizie wieloczynnikowej, omówionej w dalszej części rozdziału. Warto też zauważyć, że frekwencja rzadszego allelu w populacjach kaukaskich wynosi nieco ponad 5% [164, 167]. Tymczasem w badanej grupie frekwencja allelu *G* wyniosła 3%, a rozkład częstości genotypów był, w przeciwieństwie do pozostałych polimorfizmów, niezgodny z

równowagą Hardy-Weinberga. Interpretację uzyskanego wyniku utrudnia jednak zbyt mała liczebność badanej grupy.

Pozostałe cztery badane polimorfizmy zlokalizowane były w obrębie genów kodujących transportery ABC oraz SLC. Pierwszym z nich był *ABCB1* 3435C>T (rs1045642). Jego obecność w układzie homozygotycznym (*TT*) powoduje obniżoną stabilność mRNA, co prowadzi do spadku ekspresji białka [67, 168]. Dotychczas uzyskane wyniki badań dotyczące jego potencjalnego znaczenia klinicznego są jednak rozbieżne. W jednym z takich badań, przeprowadzonym wśród pacjentów z CML, nie wykazano związku rs1045642 ze stężeniem imatynibu u chorych czy z efektem terapeutycznym [148]. Wyniki badań przeprowadzonych w innej grupie pacjentów z CML leczonych imatynibem wskazały na związek obecności wariantu *T* z gorszą odpowiedzią na leczenie [116]. W kolejnym badaniu wykazano, że chorzy z CML, będący homozygotami *TT*, mają mniejsze szanse na uzyskanie większej lub całkowitej odpowiedzi na terapię imatynibem [36]. Także ogólne przeżycie wśród pacjentów z CML może być związane z obecnością genotypu *TT* [76]. Mimo rozbieżnych wyników przedstawionych badań, można zaobserwować związek allelu *T*, szczególnie w układzie homozygotycznym, z gorszym rokowaniem u pacjentów przyjmujących imatynib. Dlatego w ramach niniejszej pracy porównano wolne od progresji czasy przeżycia pomiędzy homozygotami *TT*, a nosicielami pozostałych wariantów (*CT+CC*). W badanej grupie pacjentów z GIST nie wykazano jednak istotnej statystycznie różnicy ($p=0,98$). Dodatkowo wykonano analizy innych kombinacji genotypów, czyli: *CC* vs *CT* vs *TT* oraz *CC* vs *CT+TT*, ale uzyskane wyniki również nie wykazały istotnych różnic. Częstość występowania alleli wynosiła: *T*-53%, *C*-47% i była zgodna z wartością uzyskaną przez inne zespoły badawcze [76]. Rozkład genotypów był zgodny z równowagą Hardy-Weinberga ($p=0,64$).

Kolejnym badanym polimorfizmem był *ABCG2* 421C>A (rs2231142), prowadzący do zamiany glutaminy w lizynę w kodonie 141 (Q141K). Komórki z ekspresją tego wariantu charakteryzują się zmniejszonym poziomem białka i obniżoną lekoopornością w porównaniu do komórek WT [71]. Polimorfizm ten był przedmiotem przywołanego już wyżej badania, w którym wykazano, że obecność wariantu *C* niekorzystnie wpływa na uzyskanie przez leczonych imatynibem pacjentów z CML większej lub całkowitej odpowiedzi molekularnej [76]. Niedawne badanie przeprowadzone w grupie pacjentów z GIST wydaje się potwierdzać te obserwacje. Badanie to wykazało, że homozygoty *AA* charakteryzują się istotnie dłuższym, wolnym od progresji czasem przeżycia niż nosi-

ciele pozostałych wariantów [82]. Niestety w ramach prezentowanej pracy wykryto tylko jedną homozygotę *AA*. Dlatego też, jedyną możliwą do przebadania kombinacją, było porównanie wariantów *CC* vs *AC+AA*. Analiza nie wykazała jednak istotnej różnicy w wolnym od progresji czasie przeżycia pomiędzy nosicielami poszczególnych wariantów. Rozkład genotypów był zgodny z równowagą Hardy-Weinberga ($p=0,89$), a frekwencja alleli wynosiła *C*-85%, *A*-15% i była zbliżona do wartości opisanych w literaturze [76].

Polimorfizm *SLC22A4* (rs1050152) powoduje zastąpienie leucyny fenyloalaniną w kodonie 503 (L503F), co jest przyczyną zmiany powinowactwa enzymu do substratu [161]. Wcześniejsze badania wykazały związek obecności wariantu *C* ze wzrostem szans na uzyskanie większej odpowiedzi na poziomie molekularnym wśród pacjentów z CML leczonych imatynibem [3]. Zbliżone wyniki otrzymano w innej badanej grupie chorych z GIST, w której obecność wariantu *C* sprzyjała wydłużeniu czasu upływającego od rozpoczęcia terapii do progresji choroby [2]. Wyniki te sugerują, że genotyp *TT* może stanowić niekorzystny czynnik rokowniczy. W związku z tym, w ramach niniejszej pracy, porównano wolne od progresji czasy przeżycia pomiędzy homozygotami *TT*, a nosicielami pozostałych wariantów (*CT+CC*). W niniejszym badaniu nie potwierdzono, by różnice pomiędzy czasami przeżycia w badanych grupach były istotne statystycznie ($p=0,98$). Wykluczono też potencjalny wpływ innych układów genotypów, czyli: *CC* vs *CT* vs *TT* oraz *CC* vs *CT+TT*. Częstość występowania alleli wyniosła *C*-63%, *T*-37% i była zbliżona do opisanych w literaturze [2]. Rozkład genotypów był zgodny z równowagą Hardy-Weinberga ($p=0,84$).

Ostatnim badanym polimorfizmem był *SLC22A5* -2087G>C (rs2631372). O wariantie tym wiadomo najmniej ze wszystkich badanych w niniejszej pracy. Wyniki wcześniejszych badań wykazały jednak jego związek z podatnością na chorobę Leśniowskiego-Crohna. Okazało się, że homozygot *CC* było znacząco więcej w grupie chorych niż w kontroli, a wariant ten wiązał się z obniżeniem ekspresji genu [134]. Ponadto, wykazano niekorzystny wpływ tego genotypu na czas upływający od rozpoczęcia terapii do progresji u pacjentów z GIST leczonych imatynibem [2]. Niestety w prezentowanej pracy nie było możliwości porównania *CC* vs *CG+GG* z uwagi na obecność tylko dwóch homozygot *CC*. Analiza alternatywnych kombinacji genotypów *CC* vs *CG* vs *GG* oraz *GG* vs *CC+CG* nie przyniosła istotnych statystycznie wyników. Frekwencje

alleli wynosiły *G*-68%, *C*-32% a rozkład genotypów był zgodny z równowagą Hardy-Weinberga ($p=0,99$) [2].

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników, można stwierdzić, że żaden z badanych polimorfizmów nie wpływał samodzielnie na wolny od progresji czas przeżycia pacjentów z GIST. Należałoby tu jednak zwrócić uwagę na kilka istotnych kwestii. Po pierwsze badana grupa jest stosunkowo niewielka i niejednolita klinicznie, dlatego też jednoznaczne wykluczenie znaczenia badanych wariantów polimorficznych byłoby przedwczesne. Po drugie brak związku pomiędzy polimorfizmami dotyczącymi enzymów z rodziny CYP2, a skutecznością terapii był brany pod uwagę. Enzymy te są bowiem tylko w nieznacznym stopniu zaangażowane w metabolizm imatynibu. Dotychczas nie opublikowano również wyników badań, które łączyłyby poszczególne warianty genów z tej grupy, z efektem leczenia pacjentów z wykorzystaniem terapii angażujących imatynib. Być może ich znaczenie ujawniłoby się u chorych z niekorzystnym układem genotypów *CYP3A4* oraz *CYP3A5*, a więc prawdopodobnie w sytuacjach epizodycznych. Po trzecie niska frekwencja rzadszych alleli w potencjalnie istotnych genach, takich jak *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCG2* oraz *SLC22A5* uniemożliwiła przeprowadzenie wiarygodnej analizy ich znaczenia dla skuteczności terapii. Zaskakiwać może brak związku z efektem leczenia polimorfizmów w genach *ABCB1* oraz *SLC22A4*. W przypadku genu *ABCB1*, potencjalnie niekorzystny efekt wariantu *T* nie został prawdopodobnie zaobserwowany ze względu na wspomnianą niską liczebność i niejednorodność kliniczną badanej grupy. Podobnie może być w przypadku wariantów dotyczących genów *SLC22A4* oraz *SLC22A5*. Dotychczas opublikowano jedną pracę poświęconą analizie wariantów tych genów w grupie pacjentów z GIST. W pracy tej autorzy przebadali warianty polimorficzne genów *SLC22A4* oraz *SLC22A5* u 54 chorych z GIST, wykazując ich wpływ na czas upływający od rozpoczęcia terapii do progresji choroby. W przebadanej grupie u 19 osób nieznana była mutacja w guzie pierwotnym, a u czterech stwierdzono inną niż w eksonie 11 mutację genu *KIT* [2]. Tymczasem w niniejszej pracy analogiczną analizę przeprowadzono w grupie 34 chorych, u których w guzach wykryto mutację eksonu 11 genu *KIT* i uwzględniono znaczenie lokalizacji guza pierwotnego. Zatem wyniki niniejszego badania wydają się być bardziej wiarygodne.

Z drugiej jednak strony w przypadku polimorfizmu dotyczącego genu *SLC22A4*, opublikowano wyniki wyraźnie potwierdzające niekorzystny wpływ wariantu *T* w układzie homozygotycznym na efekt leczenia w grupie 188 chorych z CML. Na podstawie

danych literaturowych, jak i wyników badań własnych, można stwierdzić, że wpływ pojedynczych polimorfizmów na efekt leczenia imatynibem chorych z GIST, jeśli istnieje, to nie jest tak istotny, jak innych czynników ryzyka, takich jak: rodzaj mutacji w guzie, indeks mitotyczny, wielkość czy lokalizacja guza. Także ogólny stan zdrowia pacjenta, jego sytuacja społeczno-ekonomiczna czy choćby stosowanie się do zaleceń lekarza mają bez wątpienia duże znaczenie dla efektów prowadzonego leczenia farmakologicznego. Wydaje się zatem, że chcąc jednoznacznie określić wpływ poszczególnych wariantów polimorficznych na efekt leczenia, należałoby przeprowadzić taką analizę w dużej i bardzo szczegółowo scharakteryzowanej klinicznie grupie chorych. Biorąc jednak pod uwagę proces rekrutacji pacjentów, jak i logistykę takiego badania, wydaje się to zadaniem szczególnie trudnym.

W dalszym etapie badania przeprowadzono analizę wieloczynnikową wariantów polimorficznych genu *CYP3A4* – kodującego główny enzym odpowiedzialny za metabolizm imatynibu oraz genów *ABCB1*, *ABCG2*, *SLC22A4* i *SLC22A5*. Wyniki wcześniej przeprowadzonych badań wykazały istnienie związku pomiędzy poszczególnymi wariantami polimorficznymi tych czterech genów, a skutecznością terapii z wykorzystaniem imatynibu. Następnie, w oparciu o dane literaturowe dla każdego z polimorfizmów wybrano genotypy, które mogą potencjalnie niekorzystnie wpływać na skuteczność terapii. Należą do nich: *CYP3A4* -392 *AG* lub *GG*, *ABCB1* 3435 *TT*, *ABCG2* 421 *AC* lub *CC*, *SCL22A4* 1672 *TT* i *SLC22A5* -2087 *CC*. Na podstawie wyników genotypowania pacjentów podzielono na dwie grupy. W pierwszej znaleźli się chorzy, będący nosicielami dwóch lub mniej potencjalnie niekorzystnych genotypów. Drugą grupę utworzyli pacjenci, u których wykryto co najmniej trzy takie genotypy. Statystyczne porównanie krzywych przeżycia otrzymanych dla obu grup wykazało, że nosiciele przynajmniej trzech niekorzystnych genotypów, charakteryzują się krótszym czasem przeżycia wolnego od progresji ($p=0,057$). Wynik znajduje się na granicy istotności statystycznej. Ze względu na ten fakt, jak i stosunkowo małą liczebność badanej grupy, należy traktować go z ostrożnością. Bez wątpienia, powtórzenie badania na większej grupie pacjentów z GIST pozwoliłoby na weryfikację uzyskanego w niniejszym badaniu wyniku.

Należy podkreślić, że istnieją także polimorfizmy innych genów mogące mieć wpływ na profil farmakokinetyczny imatynibu lub skuteczność leczenia w terapiach wykorzystujących ten inhibitor. Wykazano na przykład związek niektórych wariantów

polimorficznych genów *SLC22A1* oraz *SLCO1B3* z istotnymi różnicami w badanych parametrach klinicznych. Układ kilku polimorfizmów genu *SLC22A1* wiązał się z uzyskaniem większej odpowiedzi molekularnej u pacjentów z CML leczonych imatynibem. Natomiast wariant 334GG genu *SLCO1B3* wiązał się z zwiększonym tempem usuwania imatynibu, w analogicznej grupie chorych [3, 176]. Potwierdzenie wpływu określonych wariantów polimorficznych, przebadanych w ramach niniejszej pracy lub też prac innych zespołów, na skuteczność terapii przy jednoczesnym ich powiązaniu z profilem farmakokinetycznym imatynibu, mogłoby dać podstawy do stworzenia zindywidualizowanego systemu precyzyjnego dawkowania leku. Badania molekularne znanych polimorfizmów są stosunkowo proste i tanie, więc nie komplikowałyby postępowania diagnostycznego u pacjentów z GIST, a mogłyby się przyczynić do obniżenia ogólnych kosztów związanych z leczeniem. Co ważne, prowadzenie takich badań mogłoby mieć również pozytywny wpływ na poprawę skuteczności leczenia z wykorzystaniem terapii celowanej u pacjentów z GIST.

8. WNIOSKI

Na podstawie otrzymanych wyników badań, przeprowadzonych w grupie 35 pacjentów z GIST leczonych imatynibem, można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Nie wykazano związku pomiędzy poszczególnymi wariantami polimorficznymi genów CYP2C9 (rs28371674), CYP2C19 (rs4244285), CYP2D6 (rs1800716), ABCB1 (rs1045642) oraz SCL22A4 (rs1050152), a wolnym od progresji czasem przeżycia chorych.
2. Brak lub niewystarczająca częstość występowania potencjalnie istotnych genotypów dla polimorfizmów CYP3A4 (rs2740574), CYP3A5 (rs776746), CYP2C19 (rs4986893), ABCG2 (rs2231142) oraz SLC22A5 (rs2631372) uniemożliwiła przeprowadzenie wiarygodnej oceny ich ewentualnego wpływu na wolny od progresji czas przeżycia chorych z GIST.
3. Analiza wieloczynnikowa, w której badano addytywny efekt potencjalnie niekorzystnych genotypów: CYP3A4 -392 *AG* lub *GG*, ABCB1 3435 *TT*, ABCG2 421 *AC* lub *CC*, SCL22A4 1672 *TT* oraz SLC22A5 -2087 *CC*, wykazała, że współwystępowanie przynajmniej trzech powyższych wariantów polimorficznych u jednego pacjenta może istotnie wpływać na skrócenie wolnego od progresji czasu przeżycia chorych.

9. BIBLIOGRAFIA

- [1] B.Amirimani, B.Ning, A.C.Deitz, B.L.Weber, F.F.Kadlubar, T.R.Rebbeck, Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant. *Environ.Mol.Mutagen.* 42 (2003) 299-305. doi:10.1002/em.10199 [doi].
- [2] S.Angelini, M.A.Pantaleo, G.Ravegnini, C.Zenesini, G.Cavrini, M.Nannini, E.Fumagalli, E.Palassini, M.Saponara, B.M.Di, P.G.Casali, P.Hrelia, G.Cantelli-Forti, G.Biasco, Polymorphisms in OCTN1 and OCTN2 transporters genes are associated with prolonged time to progression in unresectable gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib therapy. *Pharmacol.Res.* 68 (2013) 1-6. doi:S1043-6618(12)00202-2 [pii];10.1016/j.phrs.2012.10.015 [doi].
- [3] S.Angelini, S.Soverini, G.Ravegnini, M.Barnett, E.Turrini, M.Thornquist, F.Pane, T.P.Hughes, D.L.White, J.Radich, D.W.Kim, G.Saglio, D.Cilloni, I.Iacobucci, G.Perini, R.Woodman, G.Cantelli-Forti, M.Baccarani, P.Hrelia, G.Martinelli, Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica* 98 (2013) 193-200. doi:haematol.2012.066480 [pii];10.3324/haematol.2012.066480 [doi].
- [4] C.R.Antonescu, P.Besmer, T.Guo, K.Arkun, G.Hom, B.Koryotowski, M.A.Leversha, P.D.Jeffrey, D.Desantis, S.Singer, M.F.Brennan, R.G.Maki, R.P.DeMatteo, Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin.Cancer Res.* 11 (2005) 4182-4190. doi:11/11/4182 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-04-2245 [doi].
- [5] C.R.Antonescu, G.Sommer, L.Sarran, S.J.Tschernyavsky, E.Riedel, J.M.Woodruff, M.Robson, R.Maki, M.F.Brennan, M.Ladanyi, R.P.DeMatteo, P.Besmer, Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin.Cancer Res.* 9 (2003) 3329-3337.
- [6] K.J.Bailey-Dell, B.Hassel, L.A.Doyle, D.D.Ross, Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim.Biophys.Acta* 1520 (2001) 234-241. doi:S0167478101002706 [pii].
- [7] A.Barton, S.Eyre, J.Bowes, P.Ho, S.John, J.Worthington, Investigation of the SLC22A4 gene (associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population) in a United Kingdom population of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 52 (2005) 752-758. doi:10.1002/art.20877 [doi].
- [8] A.M.Bedewy, S.M.El-Maghraby, Do SLCO1B3 (T334G) and CYP3A5*3 polymorphisms affect response in Egyptian chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy? *Hematology.* 18 (2013) 211-216. doi:hem133 [pii];10.1179/1607845412Y.0000000067 [doi].

- [9] J.Berman, T.J.O'Leary, Gastrointestinal stromal tumor workshop. *Hum.Pathol.* 32 (2001) 578-582. doi:S0046-8177(01)06377-8 [pii];10.1053/hupa.2001.25484 [doi].
- [10] C.D.Blanke, G.D.Demetri, M.M.von, M.C.Heinrich, B.Eisenberg, J.A.Fletcher, C.L.Corless, C.D.Fletcher, P.J.Roberts, D.Heinz, E.Wehre, Z.Nikolova, H.Joensuu, Long-term results from a randomized phase II trial of standard- versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing KIT. *J.Clin.Oncol.* 26 (2008) 620-625. doi:26/4/620 [pii];10.1200/JCO.2007.13.4403 [doi].
- [11] C.D.Blanke, C.Rankin, G.D.Demetri, C.W.Ryan, M.M.von, R.S.Benjamin, A.K.Raymond, V.H.Bramwell, L.H.Baker, R.G.Maki, M.Tanaka, J.R.Hecht, M.C.Heinrich, C.D.Fletcher, J.J.Crowley, E.C.Borden, Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. *J.Clin.Oncol.* 26 (2008) 626-632. doi:26/4/626 [pii];10.1200/JCO.2007.13.4452 [doi].
- [12] I.Bosch, J.Croop, P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim.Biophys.Acta* 1288 (1996) F37-F54. doi:0304-419X(96)00022-4 [pii].
- [13] J.T.Brandt, S.L.Close, S.J.Iturria, C.D.Payne, N.A.Farid, C.S.Ernest, D.R.Lachno, D.Salazar, K.J.Winters, Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J.Thromb.Haemost.* 5 (2007) 2429-2436. doi:JTH2775 [pii];10.1111/j.1538-7836.2007.02775.x [doi].
- [14] M.Brenca, S.Rossi, M.Polano, D.Gasparotto, L.Zanatta, D.Racanelli, L.Valori, S.Lamon, A.P.Dei Tos, R.Maestro, Transcriptome sequencing identifies ETV6-NTRK3 as a gene fusion involved in GIST. *J.Pathol.* 238 (2016) 543-549. doi:10.1002/path.4677 [doi].
- [15] E.Buchdunger, J.Zimmermann, H.Mett, T.Meyer, M.Muller, B.J.Druker, N.B.Lydon, Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 56 (1996) 100-104.
- [16] H.Burger, T.H.van, A.W.Boersma, M.Brok, E.A.Wiemer, G.Stoter, K.Nooter, Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* 104 (2004) 2940-2942. doi:10.1182/blood-2004-04-1398 [doi];2004-04-1398 [pii].
- [17] J.A.Carney, Carney triad. *Front Horm.Res.* 41 (2013) 92-110. doi:000345672 [pii];10.1159/000345672 [doi].
- [18] P.G.Casali, J.Y.Blau, Gastrointestinal stromal tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann.Oncol.* 21 Suppl 5 (2010) v98-102. doi:mdq208 [pii];10.1093/annonc/mdq208 [doi].
- [19] P.G.Casali, E.Fumagalli, A.Gronchi, Adjuvant therapy of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Curr.Treat.Options.Oncol.* 13 (2012) 277-284. doi:10.1007/s11864-012-0198-0 [doi].

- [20] T.K.Chau, S.Marakami, B.Kawai, K.Nasu, T.Kubota, A.Ohnishi, Genotype analysis of the CYP2C19 gene in HCV-seropositive patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Life Sci.* 67 (2000) 1719-1724. doi:S0024320500007578 [pii].
- [21] N.J.Chiang, L.T.Chen, C.R.Tsai, J.S.Chang, The epidemiology of gastrointestinal stromal tumors in Taiwan, 1998-2008: a nation-wide cancer registry-based study. *BMC.Cancer* 14 (2014) 102. doi:1471-2407-14-102 [pii];10.1186/1471-2407-14-102 [doi].
- [22] W.H.Chou, F.X.Yan, L.J.de, J.Barnhill, T.Rogers, M.Cronin, M.Pho, V.Xiao, T.B.Ryder, W.W.Liu, C.Teiling, P.J.Wedlund, Extension of a pilot study: impact from the cytochrome P450 2D6 polymorphism on outcome and costs associated with severe mental illness. *J.Clin.Psychopharmacol.* 20 (2000) 246-251.
- [23] M.H.Cohen, G.Williams, J.R.Johnson, J.Duan, J.Gobburu, A.Rahman, K.Benson, J.Leighton, S.K.Kim, R.Wood, M.Rothmann, G.Chen, U.KM, A.M.Staten, R.Pazdur, Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin.Cancer Res.* 8 (2002) 935-942.
- [24] C.Cordon-Cardo, J.P.O'Brien, D.Casals, L.Rittman-Grauer, J.L.Biedler, M.R.Melamed, J.R.Bertino, Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86 (1989) 695-698.
- [25] C.L.Corless, C.M.Barnett, M.C.Heinrich, Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. *Nat.Rev.Cancer* 11 (2011) 865-878. doi:nrc3143 [pii];10.1038/nrc3143 [doi].
- [26] C.L.Corless, J.A.Fletcher, M.C.Heinrich, Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J.Clin.Oncol.* 22 (2004) 3813-3825. doi:10.1200/JCO.2004.05.140 [doi];22/18/3813 [pii].
- [27] C.L.Corless, L.McGreevey, A.Haley, A.Town, M.C.Heinrich, KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am.J.Pathol.* 160 (2002) 1567-1572. doi:S0002-9440(10)61103-0 [pii];10.1016/S0002-9440(10)61103-0 [doi].
- [28] C.L.Corless, A.Schroeder, D.Griffith, A.Town, L.McGreevey, P.Harrell, S.Shiraga, T.Bainbridge, J.Morich, M.C.Heinrich, PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J.Clin.Oncol.* 23 (2005) 5357-5364. doi:JCO.2005.14.068 [pii];10.1200/JCO.2005.14.068 [doi].
- [29] K.F.Croom, C.M.Perry, Imatinib mesylate: in the treatment of gastrointestinal stromal tumours. *Drugs* 63 (2003) 513-522. doi:630505 [pii].
- [30] P.B.Danielson, The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr.Drug Metab* 3 (2002) 561-597.

- [31] S.M.de Morais, H.Schweikl, J.Blaisdell, J.A.Goldstein, Gene structure and upstream regulatory regions of human CYP2C9 and CYP2C18. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 194 (1993) 194-201. doi:S0006291X83718036 [pii].
- [32] S.M.de Morais, G.R.Wilkinson, J.Blaisdell, U.A.Meyer, K.Nakamura, J.A.Goldstein, Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol.Pharmacol.* 46 (1994) 594-598.
- [33] S.M.de Morais, G.R.Wilkinson, J.Blaisdell, K.Nakamura, U.A.Meyer, J.A.Goldstein, The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J.Biol.Chem.* 269 (1994) 15419-15422.
- [34] M.Dean, A.Rzhetsky, R.Allikmets, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11 (2001) 1156-1166. doi:10.1101/gr.184901 [doi].
- [35] M.Debiec-Rychter, R.Sciot, C.A.Le, M.Schlemmer, P.Hohenberger, A.T.van Oosterom, J.Y.Blays, S.Leyvraz, M.Stul, P.G.Casali, J.Zalcberg, J.Verweij, G.M.Van, A.Hagemeyer, I.Judson, KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur.J.Cancer* 42 (2006) 1093-1103. doi:S0959-8049(06)00175-4 [pii];10.1016/j.ejca.2006.01.030 [doi].
- [36] W.Deenik, B.van der Holt, J.J.Janssen, I.W.Chu, P.J.Valk, G.J.Ossenkoppele, I.P.van der Heiden, P.Sonneveld, R.H.van Schaik, J.J.Cornelissen, Polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1) predict for molecular resistance in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia receiving high-dose imatinib. *Blood* 116 (2010) 6144-6145. doi:116/26/6144 [pii];10.1182/blood-2010-07-296954 [doi].
- [37] M.W.Deininger, B.J.Druker, Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol.Rev.* 55 (2003) 401-423. doi:10.1124/pr.55.3.4 [doi];pr.55.3.4 [pii].
- [38] R.P.DeMatteo, J.J.Lewis, D.Leung, S.S.Mudan, J.M.Woodruff, M.F.Brennan, Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann.Surg.* 231 (2000) 51-58.
- [39] G.D.Demetri, M.M.von, C.R.Antonescu, R.P.DeMatteo, K.N.Ganjoo, R.G.Maki, P.W.Pisters, C.P.Raut, R.F.Riedel, S.Schuetze, H.M.Sundar, J.C.Trent, J.D.Wayne, NCCN Task Force report: update on the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *J.Natl.Compr.Canc.Netw.* 8 Suppl 2 (2010) S1-41. doi:8/Suppl_2/S-1 [pii].
- [40] G.D.Demetri, M.M.von, C.D.Blanke, A.D.Van den Abbeele, B.Eisenberg, P.J.Roberts, M.C.Heinrich, D.A.Tuveson, S.Singer, M.Janicek, J.A.Fletcher, S.G.Silverman, S.L.Silberman, R.Capdeville, B.Kiese, B.Peng, S.Dimitrijevic, B.J.Druker, C.Corless, C.D.Fletcher, H.Joensuu, Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N.Engl.J.Med.* 347 (2002) 472-480. doi:10.1056/NEJMoa020461 [doi];347/7/472 [pii].

- [41] L.A.Doyle, W.Yang, L.V.Abruzzo, T.Krogmann, Y.Gao, A.K.Rishi, D.D.Ross, A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (1998) 15665-15670.
- [42] B.J.Druker, M.Talpaz, D.J.Resta, B.Peng, E.Buchdunger, J.M.Ford, N.B.Lydon, H.Kantarjian, R.Capdeville, S.Ohno-Jones, C.L.Sawyers, Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N.Engl.J.Med.* 344 (2001) 1031-1037. doi:10.1056/NEJM200104053441401 [doi].
- [43] B.J.Druker, S.Tamura, E.Buchdunger, S.Ohno, G.M.Segal, S.Fanning, J.Zimmermann, N.B.Lydon, Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat.Med.* 2 (1996) 561-566.
- [44] R.J.Edwards, D.A.Adams, P.S.Watts, D.S.Davies, A.R.Boobis, Development of a comprehensive panel of antibodies against the major xenobiotic metabolising forms of cytochrome P450 in humans. *Biochem.Pharmacol.* 56 (1998) 377-387. doi:S0006-2952(98)00033-1 [pii].
- [45] S.A.Eraly, B.A.Hamilton, S.K.Nigam, Organic anion and cation transporters occur in pairs of similar and similarly expressed genes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 300 (2003) 333-342. doi:S0006291X0202853X [pii].
- [46] C.Fitzmaurice, C.Allen, R.M.Barber, L.Barregard, Z.A.Bhutta, H.Brenner, D.J.Dicker, O.Chimed-Orchir, R.Dandona, L.Dandona, T.Fleming, M.H.Forouzanfar, J.Hancock, R.J.Hay, R.Hunter-Merrill, C.Huynh, H.D.Hosgood, C.O.Johnson, J.B.Jonas, J.Khubchandani, G.A.Kumar, M.Kutz, Q.Lan, H.J.Larson, X.Liang, S.S.Lim, A.D.Lopez, M.F.MacIntyre, L.Marczak, N.Marquez, A.H.Mokdad, C.Pinho, F.Pourmalek, J.A.Salomon, J.R.Sanabria, L.Sandar, B.Sartorius, S.M.Schwartz, K.A.Shackelford, K.Shibuya, J.Stanaway, C.Steiner, J.Sun, K.Takahashi, S.E.Vollset, T.Vos, J.A.Wagner, H.Wang, R.Westerman, H.Zeeb, L.Zoeckler, F.Abd-Allah, M.B.Ahmed, S.Alabed, N.K.Alam, S.F.Aldahri, G.Alem, M.A.Alemayohu, R.Ali, R.Al-Raddadi, A.Amare, Y.Amoako, A.Artaman, H.Asayesh, N.Atnafu, A.Awasthi, H.B.Saleem, A.Barac, N.Bedi, I.Bensenor, A.Berhane, E.Bernabe, B.Betsu, A.Binagwaho, D.Boneya, I.Campos-Nonato, C.Castaneda-Orjuela, F.Catala-Lopez, P.Chiang, C.Chibueze, A.Chitheer, J.Y.Choi, B.Cowie, S.Damtew, N.J.das, S.Dey, S.Dharmaratne, P.Dhillon, E.Ding, T.Driscoll, D.Ekwueme, A.Y.Endries, M.Farvid, F.Farzadfar, J.Fernandes, F.Fischer, T.T.Hiwot, A.Gebru, S.Gopalani, A.Hailu, M.Horino, N.Horita, A.Husseini, I.Huybrechts, M.Inoue, F.Islami, M.Jakovljevic, S.James, M.Javanbakht, S.H.Jee, A.Kasaeian, M.S.Kedir, Y.S.Khader, Y.H.Khang, D.Kim, J.Leigh, S.Linn, R.Lunevicius, H.M.A.El Razek, R.Malekzadeh, D.C.Malta, W.Marcenes, D.Markos, Y.A.Melaku, K.G.Meles, W.Mendoza, D.T.Mengiste, T.J.Meretoja, T.R.Miller, K.A.Mohammad, A.Mohammadi, S.Mohammed, M.Moradi-Lakeh, G.Nagel, D.Nand, N.Q.Le, S.Nolte, F.A.Ogbo, K.E.Oladimeji, E.Oren, M.Pa, E.K.Park, D.M.Pereira, D.Plass, M.Qorbani, A.Radfar, A.Rafay, M.Rahman, S.M.Rana, K.Soreide, M.Satpathy, M.Sawhney, S.G.Sepanlou, M.A.Shaikh, J.She, I.Shiue, H.R.Shore, M.G.Shrime, S.So, S.Soneji, V.Stathopoulou, K.Stroumpoulis, M.B.Sufiyan, B.L.Sykes, R.Tabares-Seisdedos, F.Tadese, B.A.Tedla, G.A.Tessema, J.S.Thakur, B.X.Tran, K.N.Ukwaja, B.S.C.Uzochukwu,

- V.V.Vlassov, E.Weiderpass, T.M.Wubshet, H.G.Yebyo, H.H.Yimam, N.Yonemoto, M.Z.Younis, C.Yu, Z.Zaidi, M.E.S.Zaki, Z.M.Zenebe, C.J.L.Murray, M.Naghavi, Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 3 (2017) 524-548. doi:2588797 [pii];10.1001/jamaoncol.2016.5688 [doi].
- [47] P.Fontana, J.S.Hulot, M.P.De, P.Gaussem, Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *J.Thromb.Haemost.* 5 (2007) 2153-2155. doi:JTH2722 [pii];10.1111/j.1538-7836.2007.02722.x [doi].
- [48] R.M.Franke, E.R.Gardner, A.Sparreboom, Pharmacogenetics of drug transporters. *Curr.Pharm.Des* 16 (2010) 220-230. doi:CPD-R.M. Franke (Guchelaar) [pii].
- [49] H.Furuya, P.Fernandez-Salguero, W.Gregory, H.Taber, A.Steward, F.J.Gonzalez, J.R.Idle, Genetic polymorphism of CYP2C9 and its effect on warfarin maintenance dose requirement in patients undergoing anticoagulation therapy. *Pharmacogenetics* 5 (1995) 389-392.
- [50] C.Gambacorti-Passerini, C.P.le, L.Mologni, M.Fanelli, C.Bertazzoli, E.Marchesi, N.M.Di, A.Biondi, G.M.Corneo, D.Belotti, E.Pogliani, N.B.Lydon, Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol.Dis.* 23 (1997) 380-394. doi:S1079-9796(97)90155-8 [pii];10.1006/bcmd.1997.0155 [doi].
- [51] E.R.Gardner, H.Burger, R.H.van Schaik, A.T.van Oosterom, E.A.de Bruijn, G.Guetens, H.Prenen, F.A.de Jong, S.D.Baker, S.E.Bates, W.D.Figg, J.Verweij, A.Sparreboom, K.Nooter, Association of enzyme and transporter genotypes with the pharmacokinetics of imatinib. *Clin.Pharmacol.Ther.* 80 (2006) 192-201. doi:S0009-9236(06)00173-1 [pii];10.1016/j.clpt.2006.05.003 [doi].
- [52] W.G.Goettsch, S.D.Bos, N.Breekveldt-Postma, M.Casparie, R.M.Herings, P.C.Hogendoorn, Incidence of gastrointestinal stromal tumours is underestimated: results of a nation-wide study. *Eur.J.Cancer* 41 (2005) 2868-2872. doi:S0959-8049(05)00797-5 [pii];10.1016/j.ejca.2005.09.009 [doi].
- [53] R.G.Gronwald, D.A.Adler, J.D.Kelly, C.M.Disteche, D.F.Bowen-Pope, The human PDGF receptor alpha-subunit gene maps to chromosome 4 in close proximity to c-kit. *Hum.Genet.* 85 (1990) 383-385.
- [54] A.Hamada, H.Miyano, H.Watanabe, H.Saito, Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 307 (2003) 824-828. doi:10.1124/jpet.103.055574 [doi];jpet.103.055574 [pii].
- [55] N.Hanioka, S.Kimura, U.A.Meyer, F.J.Gonzalez, The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934--A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *Am.J.Hum.Genet.* 47 (1990) 994-1001.

- [56] A.M.Harmsze, J.W.van Werkum, J.M.Ten Berg, B.Zwart, H.J.Bouman, N.J.Breet, A.W.van 't Hof, H.J.Ruven, C.M.Hackeng, O.H.Klungel, B.A.de, V.H.Deneer, CYP2C19*2 and CYP2C9*3 alleles are associated with stent thrombosis: a case-control study. *Eur.Heart J.* 31 (2010) 3046-3053. doi:ehq321 [pii];10.1093/eurheartj/ehq321 [doi].
- [57] H.Hashimoto, K.Toide, R.Kitamura, M.Fujita, S.Tagawa, S.Itoh, T.Kamataki, Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *Eur.J.Biochem.* 218 (1993) 585-595.
- [58] L.He, K.Vasiliou, D.W.Nebert, Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum.Genomics* 3 (2009) 195-206. doi:G8272024P0255557 [pii].
- [59] M.H.Heim, U.A.Meyer, Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics* 14 (1992) 49-58. doi:S0888-7543(05)80282-4 [pii].
- [60] M.C.Heinrich, C.L.Corless, C.D.Blanke, G.D.Demetri, H.Joensuu, P.J.Roberts, B.L.Eisenberg, M.M.von, C.D.Fletcher, K.Sandau, K.McDougall, W.B.Ou, C.J.Chen, J.A.Fletcher, Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J.Clin.Oncol.* 24 (2006) 4764-4774. doi:JCO.2006.06.2265 [pii];10.1200/JCO.2006.06.2265 [doi].
- [61] M.C.Heinrich, C.L.Corless, G.D.Demetri, C.D.Blanke, M.M.von, H.Joensuu, L.S.McGreevey, C.J.Chen, A.D.Van den Abbeele, B.J.Druker, B.Kiese, B.Eisenberg, P.J.Roberts, S.Singer, C.D.Fletcher, S.Silberman, S.Dimitrijevic, J.A.Fletcher, Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J.Clin.Oncol.* 21 (2003) 4342-4349. doi:10.1200/JCO.2003.04.190 [doi];JCO.2003.04.190 [pii].
- [62] M.C.Heinrich, C.L.Corless, A.Duensing, L.McGreevey, C.J.Chen, N.Joseph, S.Singer, D.J.Griffith, A.Haley, A.Town, G.D.Demetri, C.D.Fletcher, J.A.Fletcher, PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299 (2003) 708-710. doi:10.1126/science.1079666 [doi];1079666 [pii].
- [63] M.C.Heinrich, D.J.Griffith, B.J.Druker, C.L.Wait, K.A.Ott, A.J.Zigler, Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 96 (2000) 925-932.
- [64] D.A.Hesselink, R.H.van Schaik, I.P.van der Heiden, M.van der Werf, P.J.Gregoor, J.Lindemans, W.Weimar, G.T.van, Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin.Pharmacol.Ther.* 74 (2003) 245-254. doi:10.1016/S0009-9236(03)00168-1 [doi];S0009923603001681 [pii].
- [65] S.Hirota, K.Isozaki, Y.Moriyama, K.Hashimoto, T.Nishida, S.Ishiguro, K.Kawano, M.Hanada, A.Kurata, M.Takeda, T.G.Muhammad, Y.Matsuzawa, Y.Kanakura, Y.Shinomura, Y.Kitamura, Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279 (1998) 577-580.

- [66] A.Hochhaus, S.G.O'Brien, F.Guilhot, B.J.Druker, S.Branford, L.Froni, J.M.Goldman, M.C.Muller, J.P.Radich, M.Rudoltz, M.Mone, I.Gathmann, T.P.Hughes, R.A.Larson, Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 23 (2009) 1054-1061. doi:leu200938 [pii];10.1038/leu.2009.38 [doi].
- [67] S.Hoffmeyer, O.Burk, R.O.von, H.P.Arnold, J.Brockmoller, A.Johne, I.Cascorbi, T.Gerloff, I.Roots, M.Eichelbaum, U.Brinkmann, Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 3473-3478. doi:10.1073/pnas.050585397 [doi];050585397 [pii].
- [68] I.Hostein, N.Faur, C.Primois, F.Boury, J.Denard, J.F.Emile, P.P.Bringuier, J.Y.Scoazec, J.M.Coindre, BRAF mutation status in gastrointestinal stromal tumors. *Am.J.Clin.Pathol.* 133 (2010) 141-148. doi:133/1/141 [pii];10.1309/AJCPPCKGA2QGBJ1R [doi].
- [69] T.P.Hughes, A.Hochhaus, S.Branford, M.C.Muller, J.S.Kaeda, L.Froni, B.J.Druker, F.Guilhot, R.A.Larson, S.G.O'Brien, M.S.Rudoltz, M.Mone, E.Wehrle, V.Modur, J.M.Goldman, J.P.Radich, Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood* 116 (2010) 3758-3765. doi:blood-2010-03-273979 [pii];10.1182/blood-2010-03-273979 [doi].
- [70] J.D.Huizinga, L.Thuneberg, M.Kluppel, J.Malysz, H.B.Mikkelsen, A.Bernstein, W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373 (1995) 347-349. doi:10.1038/373347a0 [doi].
- [71] Y.Imai, M.Nakane, K.Kage, S.Tsukahara, E.Ishikawa, T.Tsuruo, Y.Miki, Y.Sugimoto, C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol.Cancer Ther.* 1 (2002) 611-616.
- [72] M.Ingelman-Sundberg, S.C.Sim, A.Gomez, C.Rodriguez-Antona, Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol.Ther.* 116 (2007) 496-526. doi:S0163-7258(07)00201-X [pii];10.1016/j.pharmthera.2007.09.004 [doi].
- [73] K.Isozaki, S.Hirota, A.Nakama, J.Miyagawa, Y.Shinomura, Z.Xu, S.Nomura, Y.Kitamura, Disturbed intestinal movement, bile reflux to the stomach, and deficiency of c-kit-expressing cells in Ws/Ws mutant rats. *Gastroenterology* 109 (1995) 456-464. doi:S0016508595002411 [pii].
- [74] Y.Jin, Z.Desta, V.Stearns, B.Ward, H.Ho, K.H.Lee, T.Skaar, A.M.Storniolo, L.Li, A.Araba, R.Blanchard, A.Nguyen, L.Ullmer, J.Hayden, S.Lemler, R.M.Weinshilboum, J.M.Rae, D.F.Hayes, D.A.Flockhart, CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J.Natl.Cancer Inst.* 97 (2005) 30-39. doi:97/1/30 [pii];10.1093/jnci/dji005 [doi].

- [75] H.Joensuu, P.J.Roberts, M.Sarlomo-Rikala, L.C.Andersson, P.Tervahartiala, D.Tuveson, S.Silberman, R.Capdeville, S.Dimitrijevic, B.Druker, G.D.Demetri, Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N.Engl.J.Med.* 344 (2001) 1052-1056. doi:10.1056/NEJM200104053441404 [doi].
- [76] D.H.Kim, L.Sriharsha, W.Xu, S.Kamel-Reid, X.Liu, K.Siminovitch, H.A.Messner, J.H.Lipton, Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple candidate genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clin.Cancer Res.* 15 (2009) 4750-4758. doi:1078-0432.CCR-09-0145 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-09-0145 [doi].
- [77] L.G.Kindblom, H.E.Remotti, F.Aldenberg, J.M.Meis-Kindblom, Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am.J.Pathol.* 152 (1998) 1259-1269.
- [78] H.Kitayama, Y.Kanakura, T.Furitsu, T.Tsujimura, K.Oritani, H.Ikeda, H.Sugahara, H.Mitsui, Y.Kanayama, Y.Kitamura, ., Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* 85 (1995) 790-798.
- [79] T.S.Klose, J.A.Blaiddell, J.A.Goldstein, Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J.Biochem.Mol.Toxicol.* 13 (1999) 289-295. doi:10.1002/(SICI)1099-0461(1999)13:6<289::AID-JBT1>3.0.CO;2-N [pii].
- [80] H.Koepsell, H.Endou, The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch.* 447 (2004) 666-676. doi:10.1007/s00424-003-1089-9 [doi].
- [81] H.Koepsell, B.M.Schmitt, V.Gorboulev, Organic cation transporters. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 150 (2003) 36-90. doi:10.1007/s10254-003-0017-x [doi].
- [82] D.H.Koo, M.H.Ryu, B.Y.Ryoo, M.Y.Beck, Y.S.Na, J.G.Shin, S.S.Lee, E.Y.Kim, Y.K.Kang, Association of ABCG2 polymorphism with clinical efficacy of imatinib in patients with gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 75 (2015) 173-182. doi:10.1007/s00280-014-2630-6 [doi].
- [83] P.Kuehl, J.Zhang, Y.Lin, J.Lamba, M.Assem, J.Schuetz, P.B.Watkins, A.Daly, S.A.Wrighton, S.D.Hall, P.Maurel, M.Relling, C.Brimer, K.Yasuda, R.Venkataramanan, S.Strom, K.Thummel, M.S.Boguski, E.Schuetz, Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat.Genet.* 27 (2001) 383-391. doi:10.1038/86882 [doi];86882 [pii].
- [84] J.Lasota, C.L.Corless, M.C.Heinrich, M.Debiec-Rychter, R.Sciot, E.Wardelmann, S.Merkelbach-Bruse, H.U.Schildhaus, S.E.Steigen, J.Stachura, A.Wozniak, C.Antonescu, O.Daum, J.Martin, J.G.Del Muro, M.Miettinen, Clinicopathologic profile of gastrointestinal stromal tumors (GISTs)

with primary KIT exon 13 or exon 17 mutations: a multicenter study on 54 cases. *Mod.Pathol.* 21 (2008) 476-484. doi:modpathol20082 [pii];10.1038/modpathol.2008.2 [doi].

- [85] J.Lasota, A.Dansonka-Mieszkowska, L.H.Sobin, M.Miettinen, A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest* 84 (2004) 874-883. doi:10.1038/labinvest.3700122 [doi];3700122 [pii].
- [86] J.Lasota, A.Felisiak-Golabek, B.Wasag, A.Kowalik, S.Zieba, M.Chlopek, Z.F.Wang, T.Coates, J.Kopczynski, S.Gozdz, M.Sarlomo-Rikala, M.Miettinen, Frequency and clinicopathologic profile of PIK3CA mutant GISTs: molecular genetic study of 529 cases. *Mod.Pathol.* 29 (2016) 275-282. doi:modpathol2015160 [pii];10.1038/modpathol.2015.160 [doi].
- [87] J.Lasota, J.Kopczynski, M.Sarlomo-Rikala, R.Schneider-Stock, T.Stachura, R.Kordek, M.Michal, C.Boltze, A.Roessner, J.Stachura, M.Miettinen, KIT 1530ins6 mutation defines a subset of predominantly malignant gastrointestinal stromal tumors of intestinal origin. *Hum.Pathol.* 34 (2003) 1306-1312. doi:S0046817703004076 [pii].
- [88] J.Lasota, J.Stachura, M.Miettinen, GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid morphology. *Lab Invest* 86 (2006) 94-100. doi:3700360 [pii];10.1038/labinvest.3700360 [doi].
- [89] J.Lasota, A.Wozniak, M.Sarlomo-Rikala, J.Rys, R.Kordek, A.Nassar, L.H.Sobin, M.Miettinen, Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am.J.Pathol.* 157 (2000) 1091-1095. doi:S0002-9440(10)64623-8 [pii];10.1016/S0002-9440(10)64623-8 [doi].
- [90] B.Liegl-Atzwanger, J.A.Fletcher, C.D.Fletcher, Gastrointestinal stromal tumors. *Virchows Arch.* 456 (2010) 111-127. doi:10.1007/s00428-010-0891-y [doi].
- [91] Limon J, Genetyczne podłoże chorób nowotworowych. in: Węgleński P, Kruczyńska K. (Eds.), *Genetyka molekularna - wyadnie nowe.*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2006, pp. 400-428.
- [92] Z.Lin, L.Nelson, A.Franke, L.Poritz, T.Y.Li, R.Wu, Y.Wang, C.MacNeill, N.J.Thomas, S.Schreiber, W.A.Koltun, OCTN1 variant L503F is associated with familial and sporadic inflammatory bowel disease. *J.Crohns.Colitis.* 4 (2010) 132-138. doi:S1873-9946(09)00099-3 [pii];10.1016/j.crohns.2009.09.003 [doi].
- [93] N.N.Liu, M.Ohkouchi, Y.Hashikura, N.Kajimoto, I.Matsuda, K.Isozaki, Y.Toh, T.Takahashi, T.Nishida, S.Hirota, Extracellular domain c-kit mutation with duplication of Ser501Ala502 found in gastrointestinal stromal tumors is more imatinib- and nilotinib-sensitive than that with duplication of Ala502Tyr503. *Lab Invest* 93 (2013) 502-507. doi:labinvest201343 [pii];10.1038/labinvest.2013.43 [doi].

- [94] B.J.Longley, M.J.Reguera, Y.Ma, Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk.Res.* 25 (2001) 571-576. doi:S0145-2126(01)00028-5 [pii].
- [95] T.W.Loo, D.M.Clark, The minimum functional unit of human P-glycoprotein appears to be a monomer. *J.Biol.Chem.* 271 (1996) 27488-27492.
- [96] M.L.Lux, B.P.Rubin, T.L.Biase, C.J.Chen, T.Maclure, G.Demetri, S.Xiao, S.Singer, C.D.Fletcher, J.A.Fletcher, KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am.J.Pathol.* 156 (2000) 791-795. doi:S0002-9440(10)64946-2 [pii];10.1016/S0002-9440(10)64946-2 [doi].
- [97] M.Lv, C.Wu, Y.Zheng, N.Zhao, Incidence and survival analysis of gastrointestinal stromal tumors in shanghai: a population-based study from 2001 to 2010. *Gastroenterol.Res.Pract.* 2014 (2014) 834136. doi:10.1155/2014/834136 [doi].
- [98] Y.Ma, S.Zeng, D.D.Metcalf, C.Akin, S.Dimitrijevic, J.H.Butterfield, G.McMahon, B.J.Longley, The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood* 99 (2002) 1741-1744.
- [99] H.Maeda, A.Yamagata, S.Nishikawa, K.Yoshinaga, S.Kobayashi, K.Nishi, S.Nishikawa, Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 116 (1992) 369-375.
- [100] F.X.Mahon, F.Belloc, V.Lagarde, C.Chollet, F.Moreau-Gaudry, J.Reiffers, J.M.Goldman, J.V.Melo, MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 101 (2003) 2368-2373. doi:10.1182/blood.V101.6.2368 [doi];101/6/2368 [pii].
- [101] J.Martin, A.Poveda, A.Llombart-Bosch, R.Ramos, J.A.Lopez-Guerrero, M.J.Garcia del, J.Maurel, S.Calabuig, A.Gutierrez, J.L.Gonzalez de Sande, J.Martinez, J.A.De, N.Lainez, F.Losa, V.Alija, P.Escudero, A.Casado, P.Garcia, R.Blanco, J.M.Buesa, Deletions affecting codons 557-558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J.Clin.Oncol.* 23 (2005) 6190-6198. doi:23/25/6190 [pii];10.1200/JCO.2005.19.554 [doi].
- [102] M.T.Mazur, H.B.Clark, Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am.J.Surg.Pathol.* 7 (1983) 507-519.
- [103] F.Medeiros, C.L.Corless, A.Duensing, J.L.Hornick, A.M.Oliveira, M.C.Heinrich, J.A.Fletcher, C.D.Fletcher, KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am.J.Surg.Pathol.* 28 (2004) 889-894. doi:00000478-200407000-00007 [pii].
- [104] J.L.Mega, W.Hochholzer, A.L.Frelinger, III, M.J.Kluk, D.J.Angiolillo, D.J.Kereiakes, S.Isserman, W.J.Rogers, C.T.Ruff, C.Contant, M.J.Pencina, B.M.Scirica, J.A.Longtine, A.D.Michelson, M.S.Sabatine, Dosing clopidogrel based on

CYP2C19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease. *JAMA* 306 (2011) 2221-2228. doi:jama.2011.1703 [pii];10.1001/jama.2011.1703 [doi].

- [105] M.Miettinen, J.Lasota, Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): definition, occurrence, pathology, differential diagnosis and molecular genetics. *Pol.J.Pathol.* 54 (2003) 3-24.
- [106] M.Miettinen, J.Lasota, Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch.Pathol.Lab Med.* 130 (2006) 1466-1478. doi:RA-5-1116 [pii];10.1043/1543-2165(2006)130[1466:GSTROM]2.0.CO;2 [doi].
- [107] M.Miettinen, J.Lasota, Gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterol.Clin.North Am.* 42 (2013) 399-415. doi:S0889-8553(13)00019-8 [pii];10.1016/j.gtc.2013.01.001 [doi].
- [108] M.Miettinen, J.M.Monihan, M.Sarlomo-Rikala, A.J.Kovatch, N.J.Carr, T.S.Emory, L.H.Sobin, Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery: clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am.J.Surg.Pathol.* 23 (1999) 1109-1118.
- [109] M.Miettinen, L.H.Sobin, M.Sarlomo-Rikala, Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Mod.Pathol.* 13 (2000) 1134-1142. doi:10.1038/modpathol.3880210 [doi].
- [110] G.Monges, S.Bisot-Locard, J.Y.Blay, A.M.Bouvier, M.Urbieta, J.M.Coindre, J.Y.Scoazec, The estimated incidence of gastrointestinal stromal tumors in France. Results of PROGIST study conducted among pathologists. *Bull.Cancer* 97 (2010) E16-E22. doi:bdc.2010.1041 [pii];10.1684/bdc.2010.1041 [doi].
- [111] C.Mucciarini, G.Rossi, F.Bertolini, R.Valli, C.Cirilli, I.Rashid, L.Marcheselli, G.Luppi, M.Federico, Incidence and clinicopathologic features of gastrointestinal stromal tumors. A population-based study. *BMC.Cancer* 7 (2007) 230. doi:1471-2407-7-230 [pii];10.1186/1471-2407-7-230 [doi].
- [112] C.G.Mullighan, L.A.Phillips, X.Su, J.Ma, C.B.Miller, S.A.Shurtleff, J.R.Downing, Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 322 (2008) 1377-1380. doi:322/5906/1377 [pii];10.1126/science.1164266 [doi].
- [113] M.Nannini, A.Astolfi, M.Urbini, V.Indio, D.Santini, M.C.Heinrich, C.L.Corless, C.Ceccarelli, M.Saponara, A.Mandrioli, C.Lolli, G.Ercolani, G.Brandi, G.Biasco, M.A.Pantaleo, Integrated genomic study of quadruple-WT GIST (KIT/PDGFR/SDH/RAS pathway wild-type GIST). *BMC.Cancer* 14 (2014) 685. doi:1471-2407-14-685 [pii];10.1186/1471-2407-14-685 [doi].
- [114] M.Nannini, G.Biasco, A.Astolfi, M.A.Pantaleo, An overview on molecular biology of KIT/PDGFR wild type (WT) gastrointestinal stromal tumours

- (GIST). *J.Med.Genet.* 50 (2013) 653-661. doi:jmedgenet-2013-101695 [pii];10.1136/jmedgenet-2013-101695 [doi].
- [115] D.R.Nelson, L.Koymans, T.Kamataki, J.J.Stegeman, R.Feyereisen, D.J.Waxman, M.R.Waterman, O.Gotoh, M.J.Coon, R.W.Estabrook, I.C.Gunsalus, D.W.Nebert, P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6 (1996) 1-42.
- [116] L.N.Ni, J.Y.Li, K.R.Miao, C.Qiao, S.J.Zhang, H.R.Qiu, S.X.Qian, Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med.Oncol.* 28 (2011) 265-269. doi:10.1007/s12032-010-9456-9 [doi].
- [117] B.Nilsson, P.Bumming, J.M.Meis-Kindblom, A.Oden, A.Dortok, B.Gustavsson, K.Sablinska, L.G.Kindblom, Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a population-based study in western Sweden. *Cancer* 103 (2005) 821-829. doi:10.1002/cncr.20862 [doi].
- [118] R.Nishio, T.Shinke, H.Otake, T.Sawada, Y.Haraguchi, M.Shinohara, R.Toh, T.Ishida, M.Nakagawa, R.Nagoshi, A.Kozuki, T.Inoue, H.Hariki, T.Osue, Y.Taniguchi, M.Iwasaki, N.Hiranuma, A.Konishi, H.Kinutani, J.Shite, K.Hirata, Effect of cytochrome P450 2C19 polymorphism on target lesion outcome after drug-eluting stent implantation in japanese patients receiving clopidogrel. *Circ.J.* 76 (2012) 2348-2355. doi:DN/JST.JSTAGE/circj/CJ-12-0476 [pii].
- [119] S.A.Nowell, J.Ahn, J.M.Rae, J.O.Scheys, A.Trovato, C.Sweeney, S.L.MacLeod, F.F.Kadlubar, C.B.Ambrosone, Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.Treat.* 91 (2005) 249-258. doi:10.1007/s10549-004-7751-x [doi].
- [120] M.A.Pantaleo, M.Nannini, C.L.Corless, M.C.Heinrich, Quadruple wild-type (WT) GIST: defining the subset of GIST that lacks abnormalities of KIT, PDGFRA, SDH, or RAS signaling pathways. *Cancer Med.* 4 (2015) 101-103. doi:10.1002/cam4.325 [doi].
- [121] T.Pawson, Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur.J.Cancer* 38 Suppl 5 (2002) S3-10.
- [122] O.Pelkonen, H.Raunio, Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ.Health Perspect.* 105 Suppl 4 (1997) 767-774.
- [123] V.D.Peltekova, R.F.Wintle, L.A.Rubin, C.I.Amos, Q.Huang, X.Gu, B.Newman, O.M.Van, D.Cescon, G.Greenberg, A.M.Griffiths, P.H.St George-Hyslop, K.A.Siminovitch, Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat.Genet.* 36 (2004) 471-475. doi:10.1038/ng1339 [doi];ng1339 [pii].

- [124] B.Peng, C.Dutreix, G.Mehring, M.J.Hayes, M.Ben-Am, M.Seiberling, R.Pokorny, R.Capdeville, P.Lloyd, Absolute bioavailability of imatinib (Glivec) orally versus intravenous infusion. *J.Clin.Pharmacol.* 44 (2004) 158-162. doi:10.1177/0091270003262101 [doi];44/2/158 [pii].
- [125] B.Peng, M.Hayes, D.Resta, A.Racine-Poon, B.J.Druker, M.Talpaz, C.L.Sawyers, M.Rosamilia, J.Ford, P.Lloyd, R.Capdeville, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J.Clin.Oncol.* 22 (2004) 935-942. doi:10.1200/JCO.2004.03.050 [doi];JCO.2004.03.050 [pii].
- [126] B.Peng, P.Lloyd, H.Schran, Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin.Pharmacokinet.* 44 (2005) 879-894. doi:4491 [pii];10.2165/00003088-200544090-00001 [doi].
- [127] A.Petaïn, D.Kattygnarath, J.Azard, E.Chatelut, C.Delbaldo, B.Geoerger, M.Barrois, S.Seronie-Vivien, A.LeCesne, G.Vassal, Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of imatinib in children and adults. *Clin.Cancer Res.* 14 (2008) 7102-7109. doi:14/21/7102 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-08-0950 [doi].
- [128] L.Pochini, M.Scalise, M.Galluccio, G.Pani, K.A.Siminovitch, C.Indiveri, The human OCTN1 (SLC22A4) reconstituted in liposomes catalyzes acetylcholine transport which is defective in the mutant L503F associated to the Crohn's disease. *Biochim.Biophys.Acta* 1818 (2012) 559-565. doi:S0005-2736(11)00441-X [pii];10.1016/j.bbamem.2011.12.014 [doi].
- [129] A.Poveda, D.M.Garcia, X, J.A.Lopez-Guerrero, R.Cubedo, V.Martinez, I.Romero, C.Serrano, C.Valverde, J.Martin-Broto, GEIS guidelines for gastrointestinal sarcomas (GIST). *Cancer Treat.Rev.* 55 (2017) 107-119. doi:S0305-7372(16)30136-0 [pii];10.1016/j.ctrv.2016.11.011 [doi].
- [130] S.Prakash, L.Sarran, N.Socci, R.P.DeMatteo, J.Eisenstat, A.M.Greco, R.G.Maki, L.H.Wexler, M.P.LaQuaglia, P.Besmer, C.R.Antonescu, Gastrointestinal stromal tumors in children and young adults: a clinicopathologic, molecular, and genomic study of 15 cases and review of the literature. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 27 (2005) 179-187. doi:00043426-200504000-00002 [pii].
- [131] T.R.Rebbeck, J.M.Jaffe, A.H.Walker, A.J.Wein, S.B.Malkowicz, Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J.Natl.Cancer Inst.* 90 (1998) 1225-1229.
- [132] P.Reichardt, J.Y.Blay, I.Boukovinas, T.Brodowicz, J.M.Broto, P.G.Casali, M.Decatris, M.Eriksson, H.Gelderblom, P.Kosmidis, C.A.Le, A.L.Pousa, M.Schlemmer, J.Verweij, H.Joensuu, Adjuvant therapy in primary GIST: state-of-the-art. *Ann.Oncol.* 23 (2012) 2776-2781. doi:mds198 [pii];10.1093/annonc/mds198 [doi].
- [133] J.D.Reith, J.R.Goldblum, R.H.Lyles, S.W.Weiss, Extragastrintestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Mod.Pathol.* 13 (2000) 577-585. doi:10.1038/modpathol.3880099 [doi].

- [134] K.Repnik, U.Potocnik, Haplotype in the IBD5 region is associated with refractory Crohn's disease in Slovenian patients and modulates expression of the SLC22A5 gene. *J.Gastroenterol.* 46 (2011) 1081-1091. doi:10.1007/s00535-011-0426-6 [doi].
- [135] A.E.Rettie, L.C.Wienkers, F.J.Gonzalez, W.F.Trager, K.R.Korzekwa, Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics* 4 (1994) 39-42.
- [136] B.P.Rubin, M.C.Heinrich, C.L.Corless, Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet* 369 (2007) 1731-1741. doi:S0140-6736(07)60780-6 [pii];10.1016/S0140-6736(07)60780-6 [doi].
- [137] J.Rubio-Casadevall, J.L.Borras, C.Carmona, A.Ameijide, G.Osca, L.Vilardell, A.Izquierdo, J.Galceran, R.Marcos-Gragera, Temporal trends of incidence and survival of sarcoma of digestive tract including Gastrointestinal Stromal Tumours (GIST) in two areas of the north-east of Spain in the period 1981-2005: a population-based study. *Clin.Transl.Oncol.* 16 (2014) 660-667. doi:10.1007/s12094-013-1131-0 [doi].
- [138] Ruka W, Debiec-Rychter M, Rutkowski P, Reichardt P, Krzakowski M, Stachura J, Siedlecki J, Nasierowska-Guttmejer A, Osuch C, Sygut J, Makula D, Limon J, Jassem J, Grzesiakowska U, Jeziorski A, Nowecki Z., Aktualne postępowanie diagnostyczno-terapeutyczne u chorych na nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (GIST). *Nowotwory.J.Oncol.* 57 (2007) 181-189.
- [139] Rutkowski P, Kulig J, Krzakowski M, Osuch C, Siedlecki J, Nasierowska-Guttmejer A, Sygut J, Limon J, Jeziorski A, Grzesiakowska U, Ptaszynski K, Sluszniaik J, Polkowski W, Staroslawska E, Polkowski M, Bebenek M, Matlok M, Urbanczyk K, Olszewski W, Gluszek S, Nowecki Z., Zasady postępowania diagnostyczno-terapeutycznego u chorych na nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (GIST). *Nowotwory.J.Oncol.* 61 (2011) 70-80.
- [140] C.Sachse, J.Brockmoller, S.Bauer, I.Roots, Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am.J.Hum.Genet.* 60 (1997) 284-295.
- [141] M.Sarlomo-Rikala, A.J.Kovatich, A.Barusevicius, M.Miettinen, CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod.Pathol.* 11 (1998) 728-734.
- [142] R.Schreck, U.R.Rapp, Raf kinases: oncogenesis and drug discovery. *Int.J.Cancer* 119 (2006) 2261-2271. doi:10.1002/ijc.22144 [doi].
- [143] E.Shi, J.Chmielecki, C.M.Tang, K.Wang, M.C.Heinrich, G.Kang, C.L.Corless, D.Hong, K.E.Fero, J.D.Murphy, P.T.Fanta, S.M.Ali, S.M.De, A.M.Burgoyne, S.Movva, L.Madlensky, G.M.Heestand, J.C.Trent, R.Kurzrock, D.Morosini, J.S.Ross, O.Harismendy, J.K.Sicklick, FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in "Wild-Type" gastrointestinal stromal tumors. *J.Transl.Med.* 14 (2016) 339. doi:10.1186/s12967-016-1075-6 [doi];10.1186/s12967-016-1075-6 [pii].

- [144] A.B.Spurdle, B.Goodwin, E.Hodgson, J.L.Hopper, X.Chen, D.M.Purdie, M.R.McCredie, G.G.Giles, G.Chenevix-Trench, C.Liddle, The CYP3A4*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics* 12 (2002) 355-366.
- [145] M.R.Stratton, P.J.Campbell, P.A.Futreal, The cancer genome. *Nature* 458 (2009) 719-724. doi:nature07943 [pii];10.1038/nature07943 [doi].
- [146] J.Suchy, E.Klujso-Grabowska, J.Kladny, C.Cybulski, D.Wokolorczyk, J.Szymanska-Pasternak, G.Kurzawski, R.J.Scott, J.Lubinski, Inflammatory response gene polymorphisms and their relationship with colorectal cancer risk. *BMC.Cancer* 8 (2008) 112. doi:1471-2407-8-112 [pii];10.1186/1471-2407-8-112 [doi].
- [147] H.Takahashi, H.Echizen, Pharmacogenetics of CYP2C9 and interindividual variability in anticoagulant response to warfarin. *Pharmacogenomics.J.* 3 (2003) 202-214. doi:10.1038/sj.tpj.6500182 [doi];6500182 [pii].
- [148] N.Takahashi, M.Miura, S.A.Scott, H.Kagaya, Y.Kameoka, H.Tagawa, H.Saitoh, N.Fujishima, T.Yoshioka, M.Hirokawa, K.Sawada, Influence of CYP3A5 and drug transporter polymorphisms on imatinib trough concentration and clinical response among patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. *J.Hum.Genet.* 55 (2010) 731-737. doi:jhg201098 [pii];10.1038/jhg.2010.98 [doi].
- [149] I.Tamai, R.Ohashi, J.Nezu, H.Yabuuchi, A.Oku, M.Shimane, Y.Sai, A.Tsuji, Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J.Biol.Chem.* 273 (1998) 20378-20382.
- [150] I.Tamai, H.Yabuuchi, J.Nezu, Y.Sai, A.Oku, M.Shimane, A.Tsuji, Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett.* 419 (1997) 107-111. doi:S0014579397014415 [pii].
- [151] X.F.Tang, J.Wang, J.H.Zhang, X.M.Meng, B.Xu, S.B.Qiao, Y.J.Wu, J.Chen, Y.Wu, J.L.Chen, R.L.Gao, J.Q.Yuan, Y.J.Yang, Effect of the CYP2C19 2 and 3 genotypes, ABCB1 C3435T and PON1 Q192R alleles on the pharmacodynamics and adverse clinical events of clopidogrel in Chinese people after percutaneous coronary intervention. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 69 (2013) 1103-1112. doi:10.1007/s00228-012-1446-8 [doi].
- [152] M.Taniguchi, T.Nishida, S.Hirota, K.Isozaki, T.Ito, T.Nomura, H.Matsuda, Y.Kitamura, Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 59 (1999) 4297-4300.
- [153] C.Tarn, E.Merkel, A.A.Canutescu, W.Shen, Y.Skorobogatko, M.J.Heslin, B.Eisenberg, R.Birbe, A.Patchefsky, R.Dunbrack, J.P.Arnoletti, M.M.von, A.K.Godwin, Analysis of KIT mutations in sporadic and familial gastrointestinal stromal tumors: therapeutic implications through protein modeling. *Clin.Cancer Res.* 11 (2005) 3668-3677. doi:11/10/3668 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-04-2515 [doi].

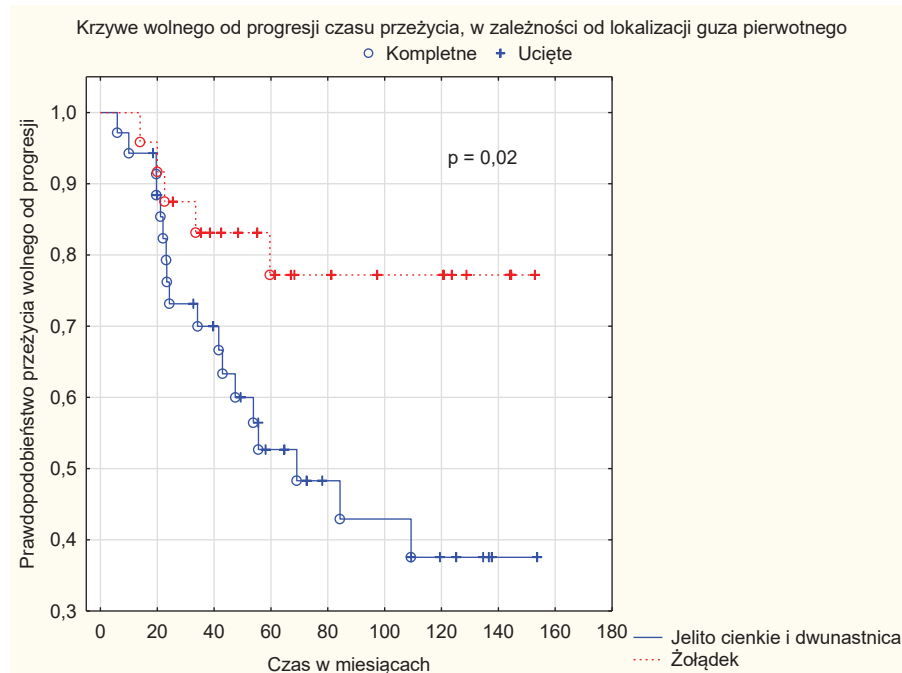
- [154] F.Thiebaut, T.Tsuruo, H.Hamada, M.M.Gottesman, I.Pastan, M.C.Willingham, Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84 (1987) 7735-7738.
- [155] S.Tokuhiro, R.Yamada, X.Chang, A.Suzuki, Y.Kochi, T.Sawada, M.Suzuki, M.Nagasaki, M.Ohtsuki, M.Ono, H.Furukawa, M.Nagashima, S.Yoshino, A.Mabuchi, A.Sekine, S.Saito, A.Takahashi, T.Tsunoda, Y.Nakamura, K.Yamamoto, An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat.Genet.* 35 (2003) 341-348. doi:10.1038/ng1267 [doi];ng1267 [pii].
- [156] S.Torihashi, K.Nishi, Y.Tokutomi, T.Nishi, S.Ward, K.M.Sanders, Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology* 117 (1999) 140-148. doi:S0016508599000414 [pii].
- [157] T.Tran, J.A.Davila, H.B.El-Serag, The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 1,458 cases from 1992 to 2000. *Am.J.Gastroenterol.* 100 (2005) 162-168. doi:AJG40709 [pii];10.1111/j.1572-0241.2005.40709.x [doi].
- [158] G.Tryggvason, H.G.Gislason, M.K.Magnusson, J.G.Jonasson, Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. *Int.J.Cancer* 117 (2005) 289-293. doi:10.1002/ijc.21167 [doi].
- [159] Tuchowska P, Worach-Kardas H, Marcinkowski JT., Najczęstsze nowotwory złośliwe w Polsce - główne czynniki ryzyka i możliwości optymalizacji działań profilaktycznych. *Probl.Hig.Epidemiol.* 94 (2013) 166-171.
- [160] D.A.Tuveson, N.A.Willis, T.Jacks, J.D.Griffin, S.Singer, C.D.Fletcher, J.A.Fletcher, G.D.Demetri, STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene* 20 (2001) 5054-5058. doi:10.1038/sj.onc.1204704 [doi].
- [161] T.J.Urban, C.Yang, L.L.Lagpacan, C.Brown, R.A.Castro, T.R.Taylor, C.C.Huang, D.Stryke, S.J.Johns, M.Kawamoto, E.J.Carlson, T.E.Ferrin, E.G.Burchard, K.M.Giacomini, Functional effects of protein sequence polymorphisms in the organic cation/ergothioneine transporter OCTN1 (SLC22A4). *Pharmacogenet.Genomics* 17 (2007) 773-782. doi:10.1097/FPC.0b013e3281c6d08e. [doi];01213011-200709000-00010 [pii].
- [162] A.E.van Herwaarden, E.Wagenaar, G.Merino, J.W.Jonker, H.Rosing, J.H.Beijnen, A.H.Schinkel, Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol.Cell Biol.* 27 (2007) 1247-1253. doi:MCB.01621-06 [pii];10.1128/MCB.01621-06 [doi].
- [163] R.H.van Schaik, Cancer treatment and pharmacogenetics of cytochrome P450 enzymes. *Invest New Drugs* 23 (2005) 513-522. doi:10.1007/s10637-005-4019-1 [doi].

- [164] R.H.van Schaik, S.N.de Wildt, N.M.van Iperen, A.G.Uitterlinden, J.N.van den Anker, J.Lindemans, CYP3A4-V polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 Dutch Caucasians. *Clin.Chem.* 46 (2000) 1834-1836.
- [165] R.H.van Schaik, I.P.van der Heiden, J.N.van den Anker, J.Lindemans, CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin.Chem.* 48 (2002) 1668-1671.
- [166] P.Walker, A.M.Dvorak, Gastrointestinal autonomic nerve (GAN) tumor. Ultrastructural evidence for a newly recognized entity. *Arch.Pathol.Lab Med.* 110 (1986) 309-316.
- [167] D.Wang, Y.Guo, S.A.Wrighton, G.E.Cooke, W.Sadee, Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics.J.* 11 (2011) 274-286. doi:tpj201028 [pii];10.1038/tpj.2010.28 [doi].
- [168] D.Wang, A.D.Johnson, A.C.Papp, D.L.Kroetz, W.Sadee, Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet.Genomics* 15 (2005) 693-704. doi:01213011-200510000-00003 [pii].
- [169] B.A.Ward, D.H.Gutmann, Neurofibromatosis 1: from lab bench to clinic. *Pediatr.Neurol.* 32 (2005) 221-228. doi:S0887-8994(04)00555-7 [pii];10.1016/j.pediatrneurol.2004.11.002 [doi].
- [170] E.Wardelmann, I.Losen, V.Hans, I.Neidt, N.Speidel, E.Bierhoff, T.Heinicke, T.Pietsch, R.Buttner, S.Merkelbach-Bruse, Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Int.J.Cancer* 106 (2003) 887-895. doi:10.1002/ijc.11323 [doi].
- [171] E.Wardelmann, S.Merkelbach-Bruse, K.Pauls, N.Thomas, H.U.Schildhaus, T.Heinicke, N.Speidel, T.Pietsch, R.Buettner, D.Pink, P.Reichardt, P.Hohenberger, Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. *Clin.Cancer Res.* 12 (2006) 1743-1749. doi:12/6/1743 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-05-1211 [doi].
- [172] J.A.Williams, B.J.Ring, V.E.Cantrell, D.R.Jones, J.Eckstein, K.Ruterbories, M.A.Hamman, S.D.Hall, S.A.Wrighton, Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos.* 30 (2002) 883-891.
- [173] World Health Organization, The global burden of disease: 2004 update., 2008.
- [174] World Health Organization, Global status report on noncommunicable diseases 2012, 2014.
- [175] S.Yalcintepe, O.Ozdemir, C.Silan, F.Ozen, A.Uludag, F.Candan, F.Silan, The CYP4502D6 *4 and *6 alleles are the molecular genetic markers for drug response: implications in colchicine non-responder FMF patients.

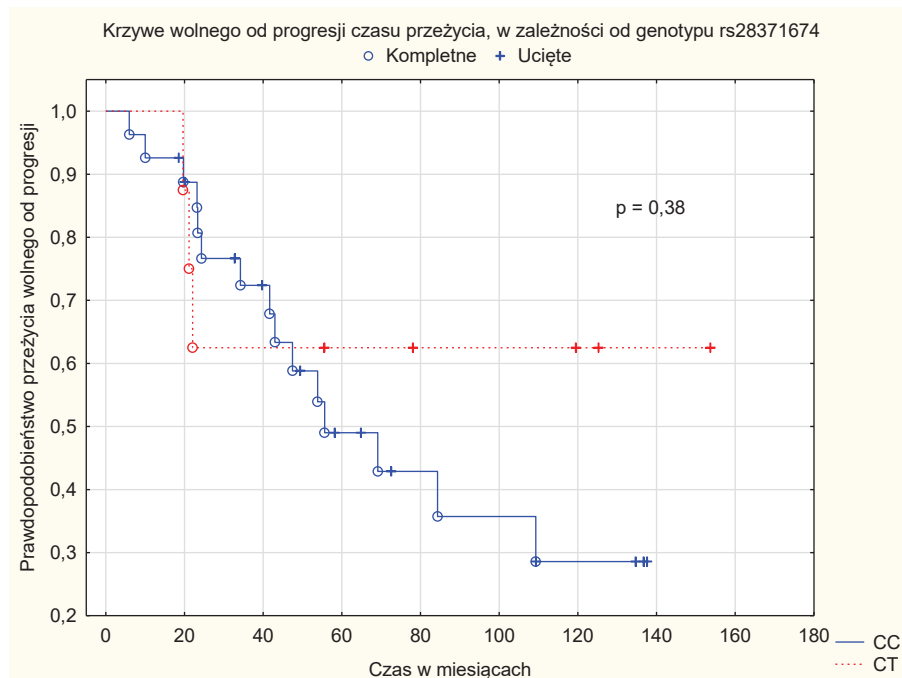
Eur.J Drug Metab Pharmacokinet. (2015). doi:10.1007/s13318-015-0255-8 [doi].

- [176] Y.Yamakawa, A.Hamada, R.Nakashima, M.Yuki, C.Hirayama, T.Kawaguchi, H.Saito, Association of genetic polymorphisms in the influx transporter SLCO1B3 and the efflux transporter ABCB1 with imatinib pharmacokinetics in patients with chronic myeloid leukemia. *Ther Drug Monit.* 33 (2011) 244-250. doi:10.1097/FTD.0b013e31820beb02 [doi].
- [177] Y.Yarden, W.J.Kuang, T.Yang-Feng, L.Coussens, S.Munemitsu, T.J.Dull, E.Chen, J.Schlessinger, U.Francke, A.Ullrich, Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 6 (1987) 3341-3351.
- [178] S.Yuzawa, Y.Opatowsky, Z.Zhang, V.Mandiyan, I.Lax, J.Schlessinger, Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell* 130 (2007) 323-334. doi:S0092-8674(07)00759-3 [pii];10.1016/j.cell.2007.05.055 [doi].
- [179] K.M.Zsebo, D.A.Williams, E.N.Geissler, V.C.Broudy, F.H.Martin, H.L.Atkins, R.Y.Hsu, N.C.Birkett, K.H.Okino, D.C.Murdock, ., Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63 (1990) 213-224. doi:0092-8674(90)90302-U [pii].

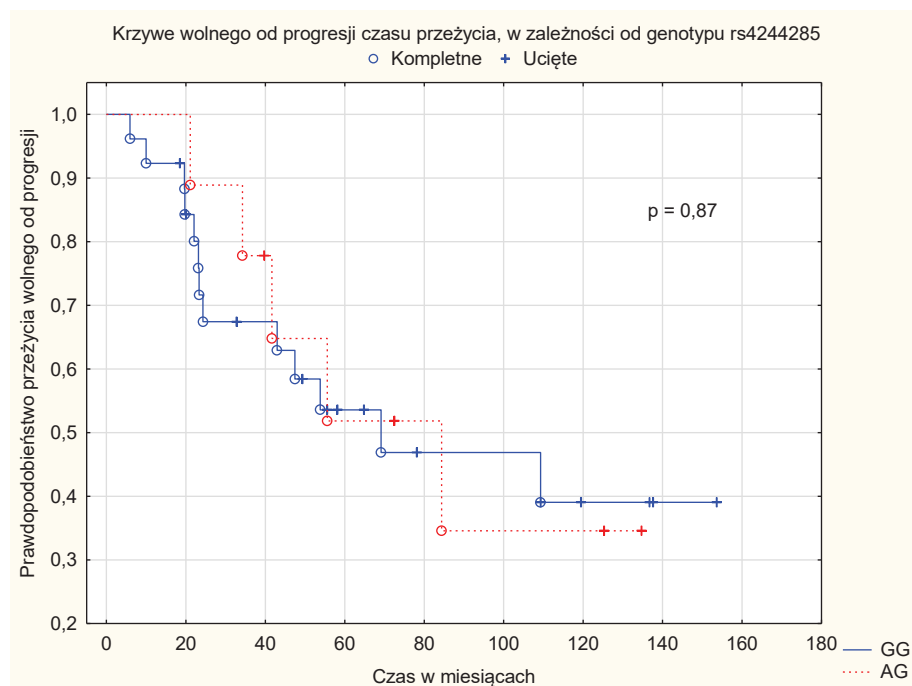
10. ZAŁĄCZNIK



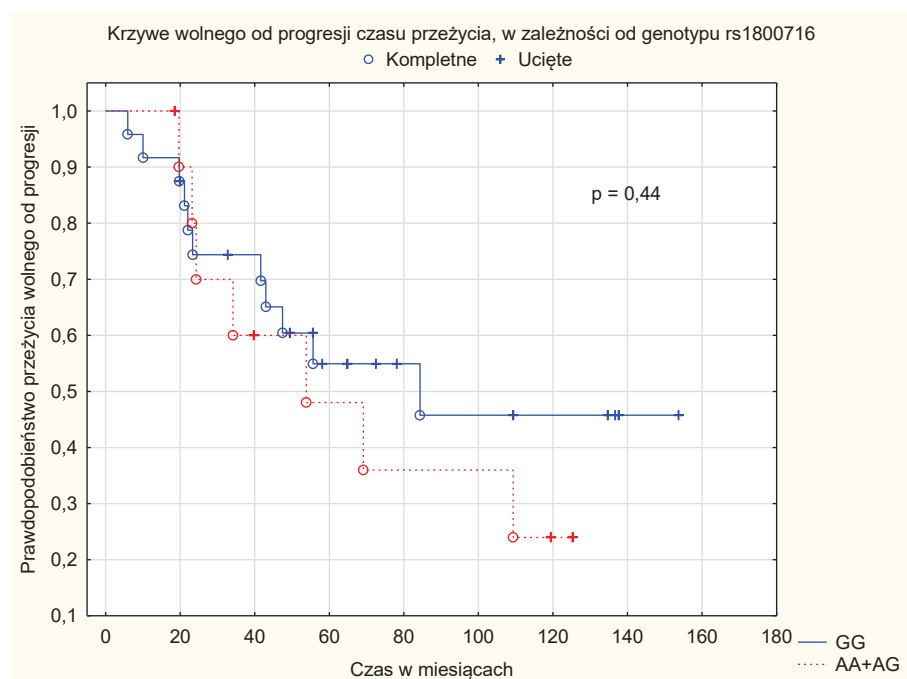
Ryc. 11. Fig. 11. Wykres krzywych przeżycia, w zależności od lokalizacji guza pierwotnego. W prawym górnym rogu zamieszczono wynik testu log-rank. *Graphic presentation of survival curves depending on primary tumor location. Results of the log-rank test placed in the top right corner.*



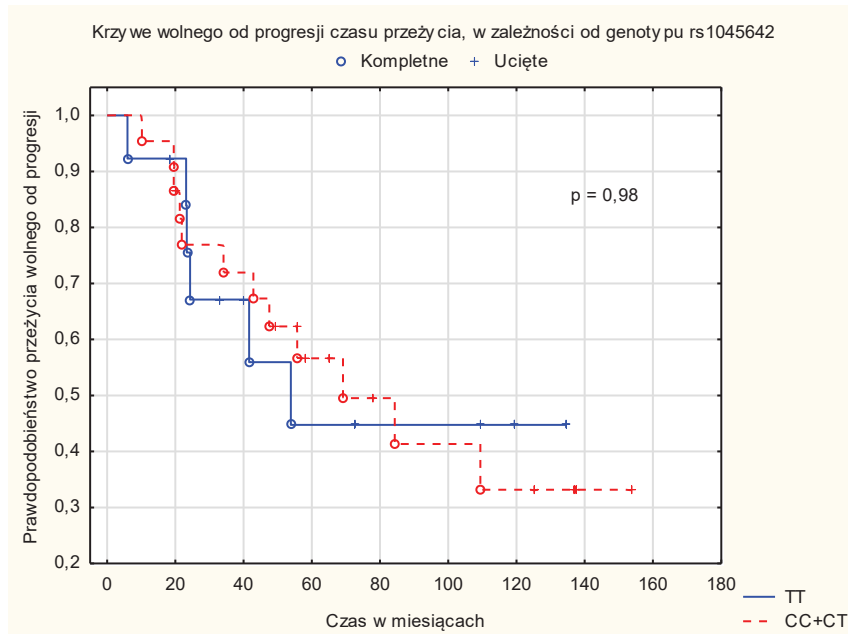
Ryc. 12. Fig. 12. Wykres krzywych przeżycia w analizie jednoczynnikowej dla polimorfizmu genu *CYP2C9* (rs28371674). W prawym górnym rogu zamieszczono wynik testu log-rank. *Graphic presentation of survival curves in univariate analysis of the *CYP2C9* (rs28371674) gene polymorphism. Results of the log-rank test placed in the top right corner.*



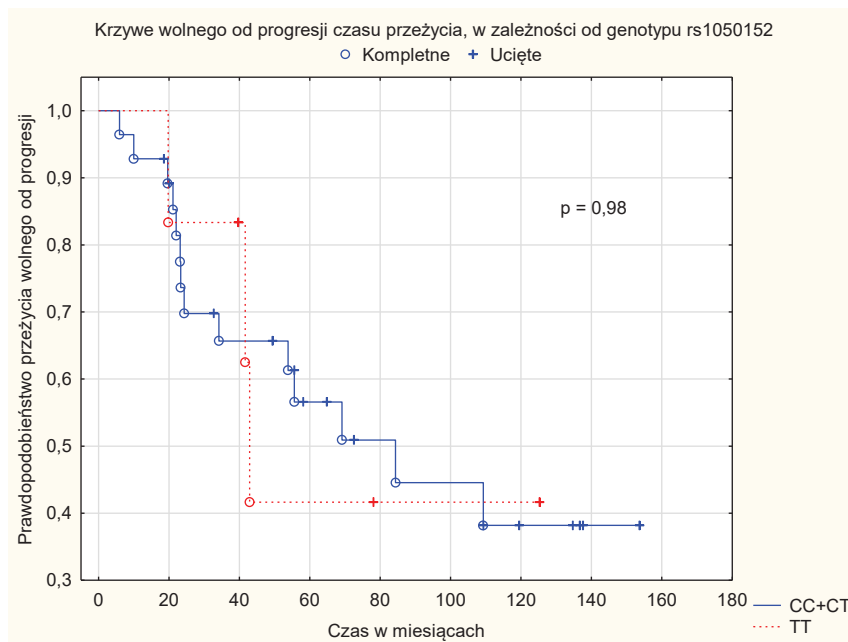
Ryc. 13. *Fig. 13.* Wykres krzywych przeżycia w analizie jednoczynnikowej dla polimorfizmu genu *CYP2C19* (rs4244285). W prawym górnym rogu zamieszczono wynik testu log-rank. *Graphic presentation of survival curves in univariate analysis of the CYP2C19 (rs4244285) gene polymorphism. Results of the log-rank test placed in the top right corner.*



Ryc. 14. *Fig. 14.* Wykres krzywych przeżycia w analizie jednoczynnikowej dla polimorfizmu genu *CYP2D6* (rs1800716). W prawym górnym rogu zamieszczono wynik testu log-rank. *Graphic presentation of survival curves in univariate analysis of the CYP2D6 (rs1800716) gene polymorphism. Results of the log-rank test placed in the top right corner.*



Ryc. 15. *Fig. 15.* Wykres krzywych przeżycia w analizie jednoczynnikowej dla polimorfizmu genu *ABCB1* (rs1045642). W prawym górnym rogu zamieszczono wynik testu log-rank. *Graphic presentation of survival curves in univariate analysis of the ABCB1 (rs1045642) gene polymorphism. Results of the log-rank test placed in the top right corner.*



Ryc. 16. *Fig. 16.* Wykres krzywych przeżycia w analizie jednoczynnikowej dla polimorfizmu genu *SLC22A4* (rs1050152). W prawym górnym rogu zamieszczono wynik testu log-rank. *Graphic presentation of survival curves in univariate analysis of the SLC22A4 (rs1050152) gene polymorphism. Results of the log-rank test placed in the top right corner.*