

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Janja KOREN

**ANALIZA KLINIČNE UPORABNOSTI
IZRAŽENOSTI RECEPTORJA SR-A1 V
NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM RAKAVEM
TKIVU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Janja KOREN

**ANALIZA KLINIČNE UPORABNOSTI IZRAŽENOSTI
RECEPTORJA SR-A1 V NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM
RAKAVEM TKIVU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANALYSIS OF CLINICAL APPLICABILITY OF SR-A1 RECEPTOR
EXPRESSION IN NON SMALL CELL LUNG CANCER TISSUE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani v laboratoriju za molekularno diagnostiko.

Študijska komisija dodiplomskega študija oddelka za biotehnologijo je dne 26.1.2010 odobrila naslov diplomskega dela in za mentorja diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Darka Černeta, za recenzenta pa izr. prof. dr. Marka Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Darko ČERNE

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

Član: izr. prof. dr. Marko KREFT

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Datum zagovora: 30. 03. 2010

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Janja KOREN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 606:616.006(043.2)
KG	pljučni rak/rast tumorja/lipidni privzem/oksidirani lipoprotein nizke gostote/ receptor čistilec A1/tumorsko in netumorsko tkivo/izražanje gena za receptor čistilec A1
AV	KOREN, Janja
SA	ČERNE, Darko (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2010
IN	ANALIZA KLINIČNE UPORABNOSTI IZRAŽENOSTI RECEPTORJA SR- A1 V NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM RAKAVEM TKIVU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 40 str., 4 sl., 8 pregl., 53 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	V raziskavi smo skušali ugotoviti potencialni pomen SR-A1 pri preskrbi tumorja z lipidi. Želeli smo preučiti, ali je izražanje gena za SR-A1 v pljučnem rakavem tkivu zvišano. Menili smo, da je v tumorju izražanje gena za SR-A1 višje kot v obtumorskem tkivu ter da je višje izražanje povezano vsaj s katerim od opazovanih kliničnih podatkov bolnikov, kot so stadij bolezni, število let kajenja, starost, spol, teža bolnikov, histološki tip tumorja, 4-letno preživetje po operaciji ter izražanje gena za LPL in njegova aktivnost. Z metodami izolacija RNA, reverzna transkripcija ter PCR v realnem času smo dobili rezultate izražanja gena <i>msr1</i> v tumorskem in obtumorskem tkivu. Izražanje gena za SR-A1 je bilo v obtumorskem tkivu 2,2 krat višje kot v tumorskem, kar je zavrglo našo hipotezo ter kaže na zaščitno vlogo SR-A1 pri pljučnem raku. Drugo hipotezo smo potrdili, saj je izražanje gena za SR-A1 v tumorskem tkivu koreliralo z izražanjem gena za LPL. Sklepamo, da gre za en tip celice (TAM ali VLC), ki sintetizira membranski SR-A1, sintetizira pa tudi LPL. Odkritje je pomembno zato, ker je zvišana aktivnost LPL-a v tumorju močan prognostični dejavnik za krajše preživetje bolnikov po operaciji. V tem primeru ima SR-A1 protumorsko vlogo. Povezav izražanja gena <i>msr1</i> v rakavem in zdravem tkivu s kliničnimi in anamnestičnimi podatki bolnikov nismo našli.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 606:616.006(043.2)
CX lung cancer /tumor growth/lipid uptake/oxidized low density
lipoprotein/scavenger receptor A1/tumor and control tissue/ gene expression of
scavenger receptor A1
AU KOREN, Janja
AA ČERNE, Darko (supervisor)
PP SI-1000, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Program in
Biotechnology
PY 2010
TI ANALYSIS OF CLINICAL APPLICABILITY OF SR-A1 RECEPTOR
EXPRESSION IN NON SMALL CELL LUNG CANCER TISSUE
DT Diplomsko delo (University studies)
NO X, 40 p., 4 fig., 8 tab., 53 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the study we attempted to determine the potential importance of SR-A1 in
the supply of lipids to the tumor. We wanted to examine whether the
expression of the gene for SR-A1 gene is increased in lung cancer tissue.
We supposed that the expression of the gene for SR-A1 is higher in tumor
tissue than in control tissue and that the higher expression is related with at
least some of the observed clinical data of patients such as stage of disease,
number of years of smoking, age, sex, patient body weight, histological type
of tumor, 4-year survival after surgery and gene expression of LPL and its
activity. We used methods of RNA isolation, reverse transcription and real
time PCR and we got results of *msr1* gene expression in tumor and control
tissue. Expression of the gene for SR-A1 was 2.2 times higher in control tissue
than in the tumor, which has rejected our hypothesis and suggests a protective
role of SR-A1 in lung cancer. The second hypothesis was
confirmed, because the expression of the gene for SR-A1 in tumor
tissue correlated with the expression of the gene for LPL. We conclude that
there is one cell type (TAM or VLC), which synthesizes membrane SR-A1, but
also synthesizes LPL. The discovery is important because the increased activity
of LPL in the tumor is a strong prognostic factor for shorter survival of
patients after surgery. In this case, the SR-A1 has protumor role. We could not
find associations of *msr1* expression in cancer and healthy tissue with clinical
and anamnestic data of patients.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 HIPOTEZE IN CILJI RAZISKAVE	1
1.3 PLJUČNI RAK	3
1.3.1 Epidemiologija pljučnega raka	3
1.3.2 Etiologija pljučnega raka	3
1.3.3 Dejavniki tveganja	4
1.3.4 Klasifikacija	5
1.3.5 Klasična diagnostika po Smernicah za diagnostiko in zdravljenje bolnikov z rakom pljuč	6
1.4 EKSOGENI IN ENDOGENI MEHANIZMI PRESKRBE RAKAVEGA TKIVA Z LIPIDI	7
1.4.1 Eksogeni mehanizmi	7
1.4.1.1 Receptorji čistilci ter povezava receptorja čistilca A1 z oksidiranim lipoproteinom nizke gostote	7
1.4.1.1.1 Receptorji čistilci A tip 1 in 2	7
1.4.1.1.2 Receptorji čistilci A tip 3	7
1.4.1.1.3 Receptorji čistilci B (CD 36)	8
1.4.1.1.4 Receptorji čistilci B tip 1 (receptor za HDL)	8
1.4.1.1.5 Receptorji čistilci A1 in oksidirani lipoprotein nizke gostote	9
1.4.1.2 Lipoproteinska lipaza	10
1.4.1.3 Apolipoprotein E	11
1.4.1.4 Receptor za lipoprotein nizke gostote	11
1.4.2 Endogeni mehanizmi	12
1.4.2.1 Sintaza maščobnih kislin	12
2 PREGLED OBJAV	15
2.1 RECEPTOR ČISTILEC A1 IN RAK	15
2.1.1 Zaščitna vloga	15
2.1.2 Protumorska vloga	16
2.1.3 Nepojasnjena vloga	18
3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 MATERIAL	20

3.1.1	Droben laboratorijski material	20
3.1.2	Aparature	20
3.2	METODE	21
3.2.1	Izolacija RNA iz vzorcev tumorskih in kontrolnih pljučnih tkiv bolnikov 21	
3.2.2	Izolacija RNA iz homogenata z ionsko izmenjevalno kromatografijo	21
3.2.3	Reverzna transkripcija	22
3.2.4	PCR v realnem času	22
3.2.5	Analiza rezultatov	24
3.2.6	Statistična analiza	24
4	REZULTATI	26
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	29
5.1	RAZPRAVA	29
5.2	SKLEPI	33
6	POVZETEK	34
7	VIRI	36
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica št. 1: Pojavnost, preživetje, operabilnost, verjetnost metastaziranja ter odziv na sistemsko zdravljenje glede na histološki tip pljučnega raka	3
Preglednica št. 2: TNM sistem zamejitve pljučnega raka.....	6
Preglednica št. 3: Endogeni ligandi receptorjev čistilcev A	8
Preglednica št. 4: Sestavine in njihovi volumni potrebni za potek reverzne transkripcije	22
Preglednica št. 5: Sestavine in njihovi volumni za master mix, potreben pri PCR v realnem času	23
Preglednica št. 6: Sestavine in njihovi volumni, ki so poleg master mixa še potrebni pri PCR v realnem času.....	23
Preglednica št. 7: Rezultati meritev Ct tarčnega gena <i>msr1</i> , hišnega gena <i>gus</i> , normalizacija SR-A1 ter razmerje SR-A1 kontrolnega in tumorskega tkiva	26
Preglednica št. 8: Klinične značilnosti in laboratorijski rezultati bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom.....	27

KAZALO SLIK

Slika 1: Histološki tipi pljučnega raka	5
Slika 2: Domenska sestava razreda A in B receptorjev čistilcev	9
Slika 3: Sinteza maščobnih kislin.	13
Slika 4: Delovanje družine od sterolov odvisni regulatorni element vezavnih proteinov na izražanje različnih genov v metabolizmu maščobnih kislin.	14

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACC	acetil-CoA karboksilaza (ang. acetyl-CoA carboxylase)
acLDL	acetilirani lipoprotein nizke gostote (acetylated low density lipoprotein)
AGE	produkti končne glikosidacije aminokislin (ang. advanced glycation end products)
ANGPTL4	angiopoietinu-podobni protein 4 (ang. angiopoietin-like protein 4)
APC	antigen predstavitvena celica (ang. antigen presenting cell)
APOE	apolipoprotein E
COX-2	ciklo-oksigenaza-2 (ang. cyclo-oxygenase-2)
CT	računalniška tomografija (ang. computed tomography)
CTL	citotoksični limfociti T
CPT-1	karnitin palmitoiltransferaza-1 (ang. carnitine palmitoyl transferase-1)
FAM	fluorescenčna sonda karboksilfluorescin
FAS	sintaza maščobnih kislin (ang. fatty acid synthase)
GSK-3 β	glikogen-sintaza-kinaza-3 β (ang. glycogen- synthase-kinase-3 β)
GUS	β -glukoronidaza
HLAII	človeški levkocitni antigeni (ang. human leukocyte antigens)
HSP	protein vročinskega šoka (ang. heat shock protein)
IFN	interferon
IL	interlevkin
KOPB	kronična obstruktivna pljučna bolezen
LDL	lipoprotein nizke gostote (ang. low density lipoprotein)
LPL	lipoproteinska lipaza
LPS	lipopolisaharid
MAPK	mitogen-aktivirana protein-kinaza
MCP-1	monocitni kemotaktični protein-1 (ang. monocyte chemotactic protein-1)
M-CSF-1	makrofagne kolonije spodbujajoči faktor 1 (ang. macrophage colony stimulating factor 1)
MDDCs	iz monocitov izviraajoče dendritične celice (ang. monocyte derived dendritic cells)

NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NF- κ B	nuklearni faktor κ B
NOS	dušikovo oksidna sintaza (ang. nitric oxide synthase)
oLAB	serumska protitelesa proti oxLDL-u
oxLDL	oksidirani LDL (ang. oxidized LDL)
PBCDs	periferne krvne dendritične celice (ang. peripheral blood dendritic cells)
PCR-SSCP	verižna reakcija s polimerazo in analiza konformacijskih polimorfizmov enoverižnih DNA (ang. polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism)
PGE2	prostaglandin E2
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza (ang. phosphoinositide-3-kinase)
PIN	prostatne intraepitelne neoplazije
PRR	vzorčno prepoznavni receptor (ang. pattern recognition receptor)
RNS	reaktivne dušikove zvrsti (ang. reactive nitrogen species)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. reactive oxygen species)
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (ang. single nucleotide polymorphism)
SR	receptorji čistilci (ang. scavenger receptor)
SREBP-1c	od sterolov odvisni regulatorni element vezavni protein-1c (ang. sterol regulatory element binding protein-1c)
TAM	tumorski makrofagi (ang. tumor associated macrophages)
TGF- β	tumorski rastni faktor- β (ang. tumour growth factor- β)
TLR	Tollu-podoben receptor (ang. Toll-like receptor)
TNF- α	tumor nekrotični faktor- α
TSP-1	trombospondin-1
VLC	vaskularni levkociti
β -ME	β -merkaptetanol

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Pljučni rak predstavlja resen zdravstveni problem, saj je najpogostejša rakava bolezen. Samo v Sloveniji vsako leto odkrijejo okoli 1200 novih primerov, približno 10 % tudi pri nekadilcih. Odkrivanje pljučnega raka je neučinkovito. Simptomi so neznatni in le okoli 16 % rakov pljuč odkrijejo v ozdravljivi fazi. Zaradi tega je še toliko bolj pomembno poznavanje etiologije pljučnega raka ter na kakšen način se širi oz. kaj mu omogoča rast in napredovanje. S takim vedenjem bomo lahko v prihodnosti razvili način/metodo, s katerim bomo najučinkoviteje zamejili ter odpravili tumor (Triller, 2009).

Znano je, da tumor s pomočjo različnih endogenih in eksogenih mehanizmov za svojo rast pridobiva lipide, kot so holesterol, višje maščobne kisline, fosfolipidi in ostale v maščobah topne spojine, ki mu služijo kot celični gradniki, energetski vir in prekursorji pomembnih sestavin. Pri eksogeni preskrbi sodelujejo lipoproteinska lipaza (LPL), apolipoprotein E (APOE), receptorji za lipoprotein nizke gostote (ang. low density lipoprotein receptor; LDLR) ter receptorji čistilci (ang. scavenger receptor, razred A (tip 1, 2, 3), B in C; SR). Pri endogenem mehanizmu sodeluje sintaza maščobnih kislin (ang. fatty acid synthase; FAS). Ti mehanizmi omogočajo tumorju pritek potrebnih hranilnih snovi za rast in razvoj.

1.2 HIPOTEZE IN CILJI RAZISKAVE

Namen diplomskega dela je ugotoviti potencialni pomen SR-A1 pri preskrbi tumorja z lipidi. Preučiti želimo, ali bi rakavo tkivo lahko pridobilo eksogene lipide z zvišanim izražanjem gena *msr1*. Želimo ugotoviti tudi, če je izražanje gena za SR-A1 morda povezano s kliničnimi podatki bolnikov, kot so stadij bolezni, število let kajenja, starost, spol, teža bolnikov, histološki tip tumorja, 4-letno preživetje po operaciji, izražanje gena za LPL in njegova aktivnost. Glede na že izvedene raziskave in dobljene podatke predvidevamo:

- da je v tumorju izražanje gena za SR-A1 višje kot v obtumorskem tkivu;
- da je višje izražanje povezano vsaj s katerim od opazovanih kliničnih podatkov bolnikov.

Da bi hipotezi dokazali, bomo zbrali vzorce tumorskega tkiva 42 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom v stadiju I, II in III, ki so jih kirurgi odvzeli na periferiji tumorja, kjer je rast največja ter vzorce netumorskega tkiva, ki so bili odvzeti na periferiji pljuč, daleč proč od tumorja. Po izolaciji RNA, reverzni transkripciji in PCR v realnem času bomo v vsakem vzorcu izmerili izražanje gena *msr1* in podatke statistično ovrednotili. Pričakujemo, da bomo hipotezi dokazali, saj ima tumor velike potrebe po lipidih. Potrjena prva hipoteza bi pomenila, da je s SR-A1 posredovana endocitoza oksidiranih lipoproteinov lahko pomemben mehanizem preskrbe tumorja z višjimi maščobnimi kislinami, holesterolom, fosfolipidi in ostalimi v maščobah topnimi spojinami, ki so nujni za rast in razvoj tumorja. Potrjena druga hipoteza pa bi dodatno potrdila pomen s SR-A1 posredovane endocitoze oksidiranih lipoproteinov pri preskrbi rakavega tkiva z lipidi. Verjamemo, da boljša preskrba vodi v napredovanje bolezni, agresiven histološki tip

tumorja ter majhno 4-letno preživetje. Poznavanje mehanizma, s katerim rakavo tkivo pridobiva hranila za rast, je vsekakor pomembno za nadaljnji razvoj, ker bi lahko preko tega mehanizma v tumor vnesli zdravila oz. toksine in ga s tem uničili.

1.3 PLJUČNI RAK

1.3.1 Epidemiologija pljučnega raka

Pljučni rak je primaren in sekundaren tumor bronhijev ali pljučnega parenhima. Pri moških je najpogostejši vzrok smrti med malignimi boleznimi, zaradi pljučnega raka pa na leto umre več kot milijon ljudi. V Evropi letno diagnosticirajo preko 150 000 novih primerov bolezni, v svetovnem merilu pa predstavlja 18 % vseh rakavih bolezni. Pojavnost pljučnega raka pri moških je v razvitih državah naraščala do devetdestih let, kasneje pa je upadla. Pri ženskah se pojavnost te vrste raka še vedno povečuje (Terčelj, 2006).

Skoraj polovica bolnikov ima ob odkritju pljučnega raka že oddaljene metastaze. Najpogostejše so pri drobnoceličnem raku (preko 90 % primerov) in žlezem (preko 80 %), manj pogoste so pri ploščatoceličnem raku (preko 50 %) (Košnik, 2005). Zato je povprečno 5-letno preživetje bolnikov samo okoli 10 – 15 %. 5-letno preživetje bolnikov s pljučnim rakom v stadiju IA in IB je 60 - 75 % (Terčelj, 2006).

Preglednica št. 1: Pojavnost, preživetje, operabilnost, verjetnost metastaziranja ter odziv na sistemsko zdravljenje glede na histološki tip pljučnega raka (The Immune Recovery Clinic of the Immune Recovery Foundation, 2009)

Lastnost	Ploščatocelični rak	Žlezni rak	Velikocelični rak	Drobnocelični rak
Ocena incidence	25-30 %	30-35 %	15-20 %	20-25 %
5-letno preživetje	25 %	12 %	13 %	1 %
Operabilnost	43-50 %	35 %	35-43 %	redko
Verjetnost metastaziranja	nizka do zmerna	zmerna	zmerna	visoka
Odziv na sistemsko zdravljenje	nizek	nizek	nizek	zmeren

1.3.2 Etiologija pljučnega raka

Oksidativni stres predstavlja neravnotežje med koncentracijo reaktivnih kisikovih (ang. reactive oxygen species; ROS) in dušikovih (ang. reactive nitrogen species; RNS) zvrsti in antioksidativnim obrambnim mehanizmom telesa. Neravnotežje je vključeno v mnoge klinične primere, med katere spadata rak in ateroskleroza (Delimaris in sod., 2007). ROS povzročajo *in vivo* oksidacijo lipidov, proteinov in DNA. Prosti radikali in lipidni peroksidi, ki pri tem nastanejo, pomembno sodelujejo pri karcinogenezi (Suzuki in sod., 2004).

Karcinogeneza je motnja celičnega ciklusa in je posledica več molekularnih sprememb na recisivnih in dominantnih genih, ki so vpleteni v uravnavanje rasti, delitve, diferenciacije in umiranja celic.

Osnova za karcinogenezo je kopičenje genetskih sprememb, ki so povezane s postopnimi histološkimi in fenotipskimi spremembami: od normalnega tkiva do prekarcinoz (metaplazije, displazije), do intraepitelnega in invazivnega raka.

Pomembna je presnova karcinogenov, njihova odstranitev ali pretvorba v dejavno obliko. Prekarcinozne spremembe bronhialne sluznice lahko nastajajo multifokalno (vpliv

karcinogenov na več predelov v pljučih), zato se lahko iz njih razvijejo sinhroni (ob istem času) ali metahroni (ob različnem času) pljučni tumorji (2 ali več) (Terčelj, 2006). Med pomembnejšimi dejavniki so v karcinogenezo vpleteni: dominantni onkogeni, ki pospešujejo rast in razvoj; recesivni, za tumorje zaviralni geni, ki uravnavajo celično smrt; geni popravljalnih mehanizmov in telomeraza. Do postopnega kopičenja molekularnih sprememb zaviralnih genov lahko privedejo zunanji dejavniki. Posledice mutacij so aktiviranje protoonkogenov (*kras*, *myc*, *bcl2*...) in utišanje za tumorje zaviralnih genov, ki skrbijo za zaviranje čezmerne rasti in spodbujajo apoptozo. Celice z okvarjenimi onkogeni in za tumorje zaviralnimi geni, se tako nemoteno delijo in kažejo v obsegu molekularnih sprememb ustrezne fenotipske spremembe-od predstopenj do invazivnega raka (Luzar in sod., 2005).

Oksidirani LDL (ang. oxidized LDL; oxLDL) nastane zaradi aktivnosti ROS *in vivo*. Nivo serumskega oxLDL-a obravnavamo kot biomarker, ki ponazarja nivo oksidativnega stresa in oksidacije lipidov *in vivo*.

Najpomembnejši parametri za ocenitev oksidativnega stresa so merjenje koncentracije oxLDL-a v serumu, določitev antioksidantov v serumu, dokazovanje različnih produktov lipidne peroksidacije in produktov oksidacije proteinov, občutljivost lipoproteinov na oksidacijo *in vitro* in tudi določitev razmerja med koncentracijo avtoprotiteles in oksidiranimi biomolekulami. Serumska ali plazemska oksidativnost, kjer seštejemo učinke hidrofilnih antioksidantov na lipidno oksidacijo, je prav tako praktični pokazatelj oksidiranosti plazemskih lipoproteinov.

Zvišan oxLDL povzroči zvišano peroksidacijo lipidov, kar vodi v intenzivnejši oksidativni stres. Oksidativni stres, povzročen z oxLDL-om, zviša vezavno afiniteto proteina p53 do DNA. Kot tumor-supresorski protein je odgovoren za zaščito genskega materiala in vzdrževanje genomske stabilnosti. Zvišane koncentracije oxLDL-a lahko povzročijo poškodbe DNA ter mutacije gena *tp53*, kar je bilo dokazano pri več kot 50 % vseh rakavih obolenj (Suzuki in sod., 2004).

1.3.3 Dejavniki tveganja

Kajenje je najpomembnejši dejavnik tveganja za nastanek raka pljuč, saj je približno 90 % moških bolnikov in 80 % bolnic s pljučnim rakom kadilcev ali bivših kadilcev. Bolj ogroženi so ljudje, ki so kadili dlje časa ali pa so začeli kaditi bolj zgodaj in pokadili večje število cigaret. Pasivno kajenje podvoji tveganje za razvoj pljučnega raka. Sestavine tobačnega dima stalno okvarjajo respiratorni epitel in tako sprožijo karcinogenezo (Košnik, 2005).

Drugi dejavniki tveganja za razvoj raka pljuč so: onesnažen zrak, azbestni prah, izpostavljenost arzeniu, radioaktivnemu sevanju, radonu, policikličnim ogljikovodikom, vinilkloridu, kromu, niklju, beriliju, kadmiju, svincu, stranski produkti pri proizvodnji aluminija, uplinjanju premoga, proizvodnji koksa, topljenju železa in jekla, pri delu z močnimi anorganskimi kislinami in izpostavljenost kremenčevemu prahu.

Pljučni rak je pogostejši pri bolnikih s kroničnimi pljučnimi boleznimi z zarišnim ali razširjenim brazgotinjenjem pljuč, kot na primer kronična obstruktivna pljučna bolezen

(KOPB), pljučne fibroze in pri tistih, ki so bili že uspešno operirani zaradi pljučnega raka ter pri bolnikih z rakom zgornjih dihal (Terčelj, 2006).

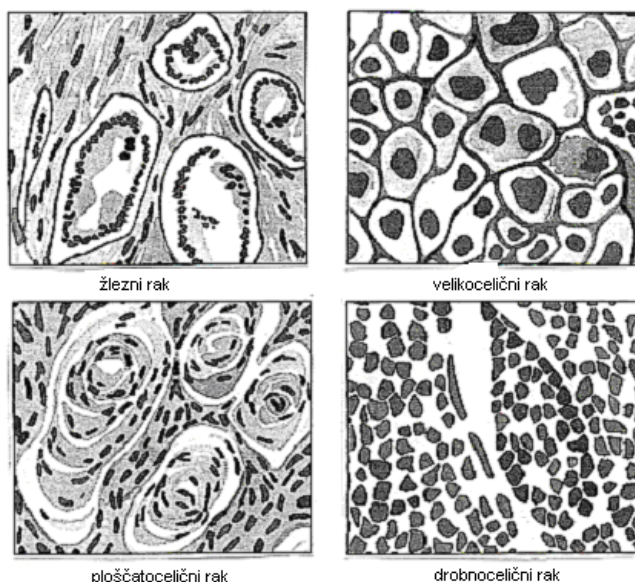
Pljučni rak je do 2-krat pogostejši v velikih mestih ali v krajih z zelo onesnaženim zrakom. Delavci, ki delajo z azbestom in nekaterimi drugimi karcinogeni (premogov katran, saje, arzen, krom, niklove spojine) v industriji azbesta, v industriji izolacijskega materiala, v ladjedelnicah in v rudnikih, imajo povečano tveganje za nastanek pljučnega raka (MedicineNet, 2009).

1.3.4 Klasifikacija

Klasifikacija tumorjev temelji na mikroskopskem pregledu izgleda celic.

Pljučni rak v grobem delimo na drobnoceličega (15-25 %) in na nedrobnocelične rake (75-85 %) ter redke ostale oblike (2-3 %). Drobnocelični rak je znan po hitri rasti z zelo zgodnjimi zasevki po telesu. Nedrobnocelični raki so: ploščatocelični rak, žlezni rak in velikocelični rak (slika 1).

Drobnocelična in nedrobnocelična vrsta raka raste in se razvijata po različnih poteh, zato je klasifikacija pomembna glede zdravljenja. Klasifikacija tumorjev glede na celični tip je včasih težka, ker so tumorji pogosto mešani. Ker se drobnocelični in nedrobnocelični zelo različno obnašajo, je zdravljenje različno. Prve zdravimo predvsem s kemoterapijo, druge, ki dalj časa ostajajo lokalizirani, pa kirurško. Ostali, manj pogosti tumorji v pljučih so še: karcinoid, limfom, adenom, bronhioloalveolarni karcinom, ki je oblika žleznega raka, hamartom, sarkom in ne nazadnje metastaze iz primarnih tumorjev drugod po telesu (Terčelj, 2006).



Slika 1: Histološki tipi pljučnega raka (The Immune Recovery Clinic of the Immune Recovery Foundation, 2009)

1.3.5 Klasična diagnostika po Smernicah za diagnostiko in zdravljenje bolnikov z rakom pljuč

Zamejitev raka določamo s TNM sistemom, kjer T določa velikost tumorja, N prizadetost bezgavk, M pa prisotnost oddaljenih metastaz. Ta sistem določa prognozo, možne načine zdravljenja in deli bolnike v različne stadije. Ločimo klinično (slike, endoskopije), kirurško (makroskopski izgled tumorja in bezgavk med operacijo) in patološko (histološki pregled) zamejitev bolezni. Stadiji so od okultnega raka do I, II, III A in B ter IV. Stadij II je operabilen, IV pa ne (Košnik, 2005).

Preglednica št. 2: TNM sistem zamejitve pljučnega raka (Debeljak in sod., 2001)

Primarni tumor	
TX	Primarnega tumorja z bronhoskopijo ali slikovnimi metodami ne moremo dokazati, rakave celice so prisotne v izpljunku ali bronhialnem izpirku
TO	Ni primarnega tumorja
Tis	Karcinom <i>in situ</i>
T1	Tumor, manjši kot 3 cm, omejen na lobarni bronhij
T2	Tumor, večji kot 3 cm, raste v glavnem bronhiju več kot 2 cm od glavne karine, vrašča v visceralno plevro, pridružena je atelektaza režnja ali pnevmonitis
T3	Tumor vrašča v: prsno steno, prepono, perikard, plevro medpljučja, manj kot 2 cm od glavne karine, atelektaza celega pljučnega krila
T4	Tumor vrašča v: medpljučje, srce, velike žile, sapnik, požiralnik, karino, vretenca, sočasno nastane karcinoma plevre, perikarda ali satelitski nodus v istem režnju
Bezgavke	
NX	Ocena lokalnih bezgavk ni možna
N0	Ni zasevkov v lokalnih bezgavkah
N1	Zasevki so v peribronhialnih in/ali hilusnih bezgavkah iste strani
N2	Zasevki so v subkarinalnih in/ali medpljučničnih bezgavkah iste strani
N3	Zasevki so v medpljučničnih, hilusnih bezgavkah nasprotne strani, nadključničnih bezgavkah iste/nasprotne strani
Oddaljeni zasevki	
MX	Oddaljenih zasevkov ne moremo opredeliti
M0	Oddaljenih zasevkov ni
M1	Oddaljeni zasevki so prisotni

1.4 EKSOGENI IN ENDOGENI MEHANIZMI PRESKRBE RAKAVEGA TKIVA Z LIPIDI

Pri razvoju tumorskega tkiva je poleg neoangiogeneze pomembna tudi preskrba z lipidi, kot so višje maščobne kisline, holesterol, fosfolipidi in ostale v maščobah topne spojine. Ti služijo kot celični gradniki (npr. membran), kot energetski vir (višje maščobne kisline) ali kot prekursorji pomembnih regulatornih spojin (prostaglandina E2, PGE2; hormonov,...) Tumorske celice lahko pridobijo lipide na dva načina: eksogeno (torej iz krvi ali okoliškega netumorskega tkiva) ali pa jih sintetizirajo same. Načini, s katerimi tumorske celice pridobivajo lipide, so v večini primerov enaki tistim, ki jih uporabljajo netumorske (FAS; LPL, endocitoza s pomočjo receptorja za LDL), različne pa so poti in aktivnosti teh poti. Zvišano izražanje genov, zvišane aktivnosti encimov in večje število receptorjev so nekateri izmed dejavnikov, ki ločujejo tumorske celice od normalnih in jih izkoriščamo v diagnostiki, prognozi in tudi terapiji rakavih obolenj (Young in Anderson, 2008).

1.4.1 Eksogeni mehanizmi

1.4.1.1 Receptorji čistilci ter povezava receptorja čistilca A1 z oksidiranim lipoproteinom nizke gostote

1.4.1.1.1 Receptorji čistilci A tip 1 in 2

So v makrofagih, Kupfferjevih celicah (jetra), alveolarnih makrofagih in nadledvični žlezi. Na endotelijskih celicah so nekoliko drugačni receptorji, ki pa so prav tako sposobni vezave acetiliranega lipoproteina nizke gostote (ang. acetylated low density lipoprotein; acLDL). Ligandi so acLDL, oxLDL, produkti končne glikosidacije aminokislin (ang. advanced glycation end products; AGE), lipopolisaharid (LPS; sestavine bakterij in toksinov) in apoptotične celice. Najmočnejše vežejo acLDL, nato AGE in potem oxLDL. Zgrajeni so iz α -vijačnice, kolagenskega raztežaja, membranskega in intracelularnega dela. Kolagenski raztežaj ima ponavljajoče zaporedje pozitivnih nabojev aminokisline lizin, ki veže negativno nabite ligande. Pretežno se nahajajo na makrofagih aterosklerotičnih arterij (v zdravi arteriji jih ni), kar močno prispeva h kopičenju lipidov v makrofagih. Njihovo izražanje na makrofagih uravnavajo mnogi citokini in številni faktorji (monocitni kemotaktični protein-1; ang. monocyte chemotactic protein-1, MCP-1; tumorski rastni faktor- β ; ang. tumour growth factor- β ; TGF- β ; tumor nekrotični faktor- α ; TNF- α in produkti trombocitov).

1.4.1.1.2 Receptorji čistilci A tip 3

So v makrofagih vranice in bezgavk. Ligandi so acLDL in bakterije (negativno nabiti lipopolisaharidi stene bakterij). Nimajo α -vijačnice, kolagenski raztežaj je daljši, imajo še membranski in intracelularni del. Kolagenski raztežaj ima ponavljajoče zaporedje pozitivnih nabojev aminokisline lizin, ki veže negativno nabite ligande, enako kot SR-A tip 1 in 2. Niso pomembni za razvoj ateroskleroze, bolj predstavljajo obrambo organizma pred bakterijskimi infekcijami.

Preglednica št. 3: Endogeni ligandi receptorjev čistilcev A (Plüddemann in sod., 2007: 214)

Ligand	SR-A
AcLDL	+
OxLDL	+
HDL	-
LDL	-
VLDL	Ni določeno
B-Amiloid	+
Molekulski šaperoni	Kalretikulin gp96
ECM	Biglikan dekorin spremenjeni kolagen tipa I, III in IV
AGE	+
Apoptotične celice	+
Ostalo	Aktivirane celice B

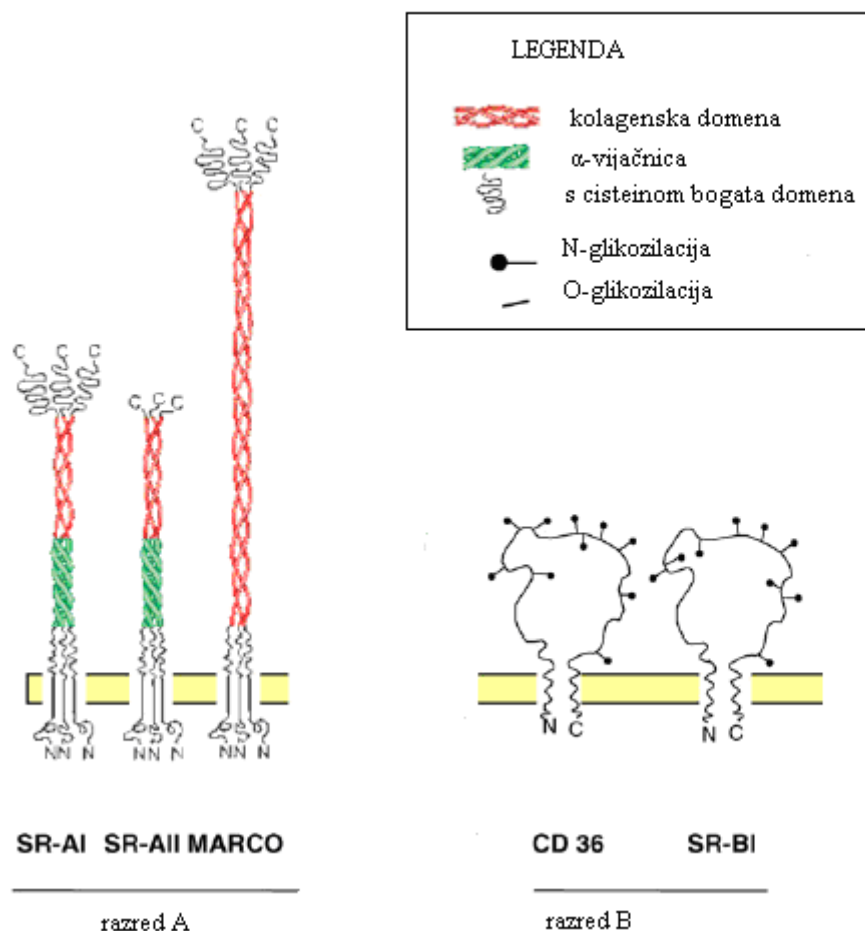
Acetilirani lipoprotein nizke gostote, ang. acetylated low density lipoprotein, acLDL; oksidirani lipoprotein nizke gostote, ang. oxidized LDL, oxLDL; lipoprotein visoke gostote, ang. high density lipoprotein, HDL; lipoprotein nizke gostote, ang., low density lipoprotein, LDL; lipoprotein zelo nizke gostote, ang. very low density lipoprotein, VLDL, ekstracelularni matriks, ang. extracellular matrix, ECM; produkti končne glikoksidacije aminokislin, AGE

1.4.1.1.3 Receptorji čistilci B (CD 36)

So v endoteliju, eritrocitih, trombocitih, monocitih in makrofagih aterosklerotičnih lezij. Ligandi so kolagen, trombospondin-1 (TSP-1), oxLDL, apoptotične celice. Zgrajeni so iz dveh membranskih regij. Ker so prisotni v aterosklerotični leziji, lahko prispevajo k nastanku ateroskleroze.

1.4.1.1.4 Receptorji čistilci B tip 1 (receptorji za HDL)

Se nahajajo v jetrih, nadledvični žlezi, pa tudi v fibroblastih, makrofagih. Ligandi so HDL (prepoznavna APOA1 in ne APOA2) in oxLDL. Zgradba je podobna zgradbi CD36. Sodeluje v reverznem transportu, kar ima zaščitno vlogo v razvoju ateroskleroze (Černe, 2008).



Slika 2: Domenska sestava razreda A in B receptorjev čistilcev (Plüddemann in sod., 2007: 208)

1.4.1.1.5 Receptorji čistilci A1 in oksidirani lipoprotein nizke gostote

Da bi ugotovili povezavo med oksidativnim stresom, oxLDL-om in serumskimi protitelesi proti oxLDL-u (oLAB) ter tveganjem za nastanek raka, so opravili številne študije. OLAB namreč nastanejo kot imunski odgovor na oxLDL in pomembno vplivajo na vzdrževanje nizkega nivoja krvnega ox-LDL-a. Njihov serumski nivo je odvisen tudi od različnih dejavnikov življenjskega stila, kot so prehranski vnos antioksidantov in kajenje. Pri zdravih posameznikih je nivo plazemskih oLAB negativno povezan z nivojem plazemskega oxLDL-a.

V eni izmed raziskav so preučevali kolorektalni rak in rezultati so potrdili njihove domneve, da višji nivo serumskega oxLDL-a povečuje tveganje za nastanek te vrste raka. (Suzuki in sod., 2004) OxLDL ter oLAB so merili tudi pri pacientkah z rakom dojke in ovarijskega. Nivo oxLDL-a je bil zvišan pri obeh skupinah bolnic v primerjavi s kontrolo, dodatno pa so bili pri bolnicah z rakom dojke povišani še serumski celotni holesterol, LDL

holesterol in oLAB. Dobljeni rezultati dokazujejo povezavo med oksidativnim stresom, oxLDL-om in procesom karcinogeneze (Delimaris in sod., 2007).

Ker naj bi bil rak posledica oksidativnega stresa oz. višjega nivoja oxLDL-a, bi lahko SR-A1, ki je receptor oxLDL-a, z višjim izražanjem v tumorju poskrbel za boljšo preskrbo le tega s potrebnimi hranili. Višje izražanje SR-A1 bi omogočilo vezavo več oxLDL-a, to pa bi pomenilo več hranilnih snovi za tumorsko tkivo.

1.4.1.2 Lipoproteinska lipaza

LPL je glavni encim, ki je odgovoren za hidrolizo krožečih trigliceridov. Najdemo ga predvsem v maščobnem tkivu, srčnih in skeletnih mišicah pa tudi v diferenciranih makrofagih, možganih, placenti, pljučih in β -celicah pankreasa.

Fiziološka aktivnost LPL-a:

- hidrolizira trigliceride na lipoproteinih, bogatih s trigliceridi (hilomikroni in VLDL);
- LPL je sposoben vezave na lipoproteine neodvisno od njegove lipolizne aktivnosti, kar mu omogoči, da veže lipoproteine na steno žilja (t.i. »bridging« funkcija);
- LPL olajša vezavo lipoproteinov na številne membranske receptorje (receptor za LDL, megalin);
- LPL lahko vpliva na selektiven privzem lipofilnih vitaminov (A, E) brez hkratnega privzema ostalih sestavin lipoproteina (Merkel in sod., 2002).

Tkivno specifična regulacija aktivnosti LPL-a in genskega izražanja zagotavlja kontrolo nad privzemom prostih maščobnih kislin, lipidov in lipoproteinov v tarčna tkiva (Preiss-Landl, 2002).

Z merjenjem aktivnosti LPL-a pri bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim rakom so ugotovili, da je aktivnost LPL-a v rakavem tkivu zvišana, medtem ko je v okoliškem nerakavem tkivu aktivnost znižana. To kaže na to, da tumor uravnava aktivnost LPL-a v obtumorskem tkivu; jo zniža, in tako omogoči mobilizacijo lipidov in prostih maščobnih kislin v tumorsko tkivo, ki na tak način preživi in raste. Možna mehanizma inhibicije aktivnosti LPL-a sta dva:

- inhibicija z inhibicijskimi faktorji, ki jih sintetizirajo tumorske ali netumorske celice (npr. citokini, kot sta na primer levkemija inhibični faktor, ang. leukemia inhibitory factor; LIF in $\text{TNF-}\alpha$);
- pretvorba aktivne dimerne oblike LPL-a v neaktivno monomerno obliko encima (z angiopoietin-podobnim proteinom 4, ang. angiopoietin-like protein 4; ANGPTL4 ali z doslej še neznanim mehanizmom).

Znižana aktivnost LPL-a v obtumorskem tkivu pa pomeni deprimiran prehrabeni in energijski status tega tkiva, kar posledično vodi v višje izražanje gena *lpl* (Černe in sod., 2007).

1.4.1.3 Apolipoprotein E

APOE je sestavni del lipoproteinov, bogatih s trigliceridi. Sposoben je vezave na specifične receptorje v jetrih in perifernih celicah ter prenaša lipoproteine, maščobotopne vitamine in holesterole v kri in limfni sistem. Nenormalnosti v delovanju APOE povezujemo s hiperlipoproteinemijo tip III, aterosklerozo in Alzheimerjevo boleznijo.

Povsem običajen fiziološki mehanizem je, da tkivo oz. celice zvišajo sintezo APOE in ga izločajo v kri. APOE v krvi obogati lipoproteine in tako obogateni se lažje vežejo na receptor za LDL, pa tudi na LDL receptorju soroden protein, receptor za VLDL... Tako tkivo dobi več maščob in ima s tem boljše možnost obnavljanja oz. rasti. Tak način popravljanja uporabljajo tudi poškodovana tkiva v centralnem živčnem sistemu, placenta pri preskrbi zarodka s hranili,... (Trošt in sod., 2008).

Raziskave v zadnjem času kažejo na povečano izražanje gena *apoE* pri raku na jajčnikih, prostati, debelem črevesu, dojki in pankreasu (Chen in sod., 2005).

Študije so pokazale da je tudi v odrezanem vzorcu pljučnega raka zvišano izražanje gena *apo E* in zvišana koncentracija proteina APOE. Povišane vrednosti v vzorcih pljučnega raka in drugih vrst raka nakazujejo, da je morda gen za APOE vpleten v razvoj tumorja.

Zvišana koncentracija APOE v rakavem tkivu je posledica vsaj treh mehanizmov:

- vstopanje APOE iz periferije (verjetno krvi) v rakavo tkivo;
- zvišana znotrajcelična sinteza APOE;
- razgradnja APOE z intracelularnimi proteazami po receptorski endocitozi preko receptorjev za LDL (zvišano izražanje v določenih tumorjih).

Žal pa je bilo ugotovljeno, da zelo visoko izražanje gena *apo E* in visoka koncentracija proteina APOE niso povezane s stadijem raka, histološkim tipom tumorja, niti ne predvidevajo preživetja bolnika (Trošt in sod., 2008).

1.4.1.4 Receptor za lipoprotein nizke gostote

Receptor za LDL je transmembranski protein, ki posreduje pri endocitozi s holesterolom bogatega LDL-a. Odkrila sta ga Goldstein in Brown, za kar sta prejela Nobelovo nagrado. Preko tega receptorja se presnovi 70-80 % LDL-a. Nahaja se v mišicah, fibroblastih, endoteliju, limfocitih in monocitih/makrofagih, jetrih, nadledvični žlezi. Veže APOB, pa tudi APOE in sicer 20-krat hitreje kot APOB.

Po sestavi je glikoprotein iz 839 aminokislin. Ima približno 2 ogljikohidratni (OH) verigi vezani preko N-asparaginske kisline in približno 18 OH verig vezanih preko O serina ali treonina; $\frac{2}{3}$ OH verig vezanih preko kisika je zbranih skupaj (Černe, 2008).

Izražanje receptorja za LDL je v normalnih tkivih uravnava preko negativne povratne zanke s koncentracijo znotrajceličnega holesterola. Pri tumorskem tkivu (rak prostate, kolorektalni rak) pa je ta zanka okvarjena. Okvarjena regulacija omogoča tumorskemu

tkivu privzem visokih količin maščobnih kislin, holesterola in ostalih lipidov, kar omogoči preskrbo celic z dodatnim virom energije ter strukturnih molekul za pospeševanje nekontrolirane rasti tumorjev. Receptor za LDL zagotavlja preskrbo celic s pomembnimi maščobnimi kislinami za sintezo PGE2. PGE je pomemben produkt ciklo-oksigenaze-2 (ang. cyclo-oxygenase-2; COX-2), ki spodbuja proliferacijo in rast tumorja.

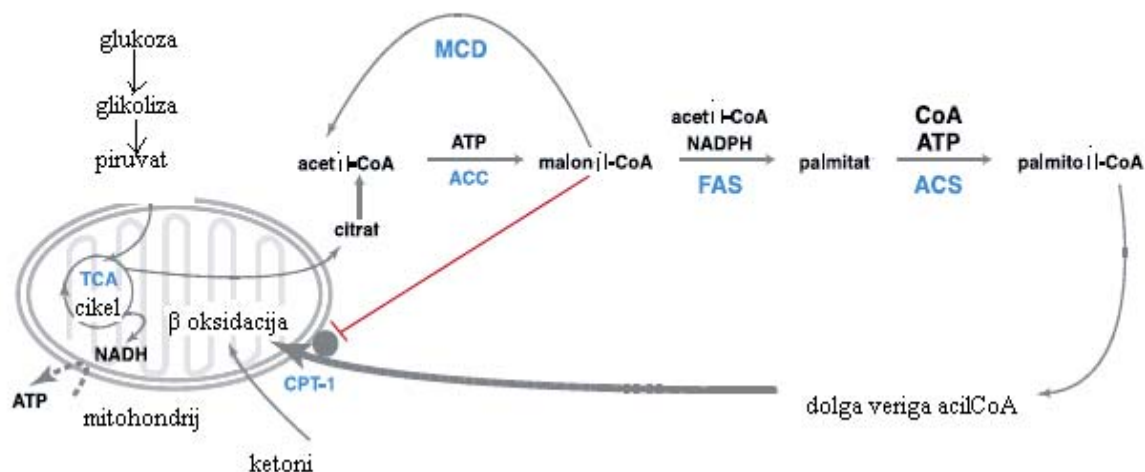
V normalnem tkivu je nižje izražanje receptorja za LDL kot v rakavem tkivu. Neregulirano izražanje receptorja za LDL je eden od možnih mehanizmov, s katerim tumor posebej pridobiva maščobne kisline, holesterol, fosfolipide in ostale v maščobah topne spojine za sintezo in stimulacijo rasti (Hughes-Fulford in sod., 2001).

1.4.2 Endogeni mehanizmi

1.4.2.1 Sintaza maščobnih kislin

FAS je protein, ki je sposoben *de novo* sinteze dolgoverižnih maščobnih kislin iz acetil-koencima A (acetil-CoA), malonil-koencima A (malonil-CoA) in nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH). Je ključni biosintetski encim v sintezni poti maščobnih kislin. Kljub temu pa je acetil-CoA karboksilaza (ang. acetyl-CoA carboxylase; ACC) tisti, ki narekuje hitrost sinteze maščobnih kislin. FAS je aktiven v tumorskih celicah, proizvaja predvsem 16-C nasičeno maščobno kislino palmitat.

V normalnih tkivih se sinteza maščobnih kislin začne, ko je energija v obliki ogljikovih hidratov v presežku (skladiščenje energije v trigliceridih). Pri sintezi dolgoverižnih maščobnih kislin je pomembno, da visok nivo malonil-CoA inhibira karnitin palmitoiltransferazo-1 (ang. carnitine palmitoyl transferase-1; CPT-1), ki omejuje nivo β oksidacije maščobnih kislin v mitohondrijih. To vodi v zvišano skladiščenje trigliceridov. Med stradanjem je izražanje in aktivnost FAS regulirano navzdol, nivo malonil-CoA se zniža, kar vodi v oksidacijo maščobnih kislin in omogoči preživetje organizma (slika 3) (Kuhajda, 2006).

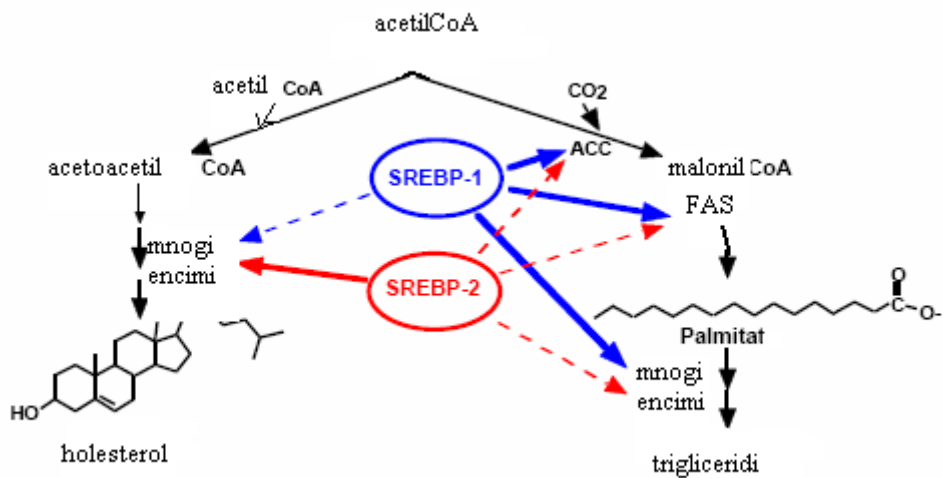


Slika 3: Sinteza maščobnih kislin; visok nivo malonil-CoA inhibira karnitin palmitoiltransferazo-1, ta pa omeji nivo β oksidacije maščobnih kislin v mitohondrijih (Kuhajda, 2006: 5978)

V nasprotju z lipogenimi tkivi pa tumorske celice ne skladiščijo trigliceridov v veliki meri. Maščobne kisline, ki so endogeno sintetizirane v tumorskih celicah, se esterificirajo v fosfolipide (npr. fosfatidilholin) in ne v trigliceride (Kuhajda in sod., 1994). Sinteza maščobnih kislin je transkripcijsko regulirana s hormoni ali onkogeni kinazne signalne poti in ne s prehranskimi vplivi kot pri normalnih lipogenih tkivih. Poleg teh razlik pa se razlikujejo tudi posledice inhibicije FAS v normalnih in rakavih celicah. Inhibicija v človeških rakavih celicah inducira apoptotično smrt teh celic tako *in vitro* kot *in vivo*, kar nakazuje na povezavo med preživetjem rakavih celic in aktivnostjo FAS (Pizer in sod., 2000).

Izražanje FAS je povišano pri različnih oblikah raka (rak na dojki, ovarijih in prostati, pljučni in kolorektalni rak).

V normalnem tkivu je izražanje FAS doseženo z indukcijo transkripcije, ki je regulirano z inzulinom, glukagonom, glukokortikoidi in ščitničnimi hormoni (Kuhajda, 2006). V rakavih tkivih pa je izražanje FAS najverjetneje nadzorovano preko mitogen-aktivirane protein-kinazne (MAPK) in fosfatidilinozitol-3-kinazne (ang. phosphoinositide-3-kinase; PI3K) poti. Pri študijah na humanih celičnih linijah kolorektalnega raka so ugotovili, da inhibitorji MAPK in PI3K navzdol regulirajo nivo od sterolov odvisni regulatorni element vezavni protein-1c (ang. sterol regulatory element binding protein-1c; SREBP-1c) in s tem zmanjšajo transkripcijo promotorja FAS, kar vodi v znižano izražanje FAS in manjšo sintezo maščobnih kislin (slika 4) (Yang in sod., 2002).



Slika 4: Delovanje družine od sterolov odvisnih regulatornih elementov vezavnih proteinov na izražanje različnih genov v metabolizmu maščobnih kislin. Debele črte ponazarjajo pomembnejša mesta delovanja SREBP, črtkane pa manj pomembna mesta delovanja. ACC, acetyl-CoA karboksilaza (Osborne, 2000: 32380)

2 PREGLED OBJAV

2.1 RECEPTOR ČISTILEC A1 IN RAK

V študijah, ki so jih do sedaj opravili, so ugotovili, da ima SR-A1 v povezavi z rakom več vlog. V nekaterih primerih je deloval zaščitno, v drugih protumorsko, v nekaterih raziskavah pa niso našli nobene povezave med SR-A1 in rakom.

2.1.1 Zaščitna vloga

Yang in sodelavci (2004) so preučevali izražanje SR-A1 v prostatnih intraepitelnih neoplazijskih (PIN) lezijah raka prostate. Pri delu so uporabili dvojno imunofluorescenčno označevanje z monoklonskimi protitelesi proti SR-A1 in proti celičnim označevalcem makrofagov in dendritičnih celic. Število pozitivnih celic SR-A1 je bilo v PIN lezijah precej povečano v primerjavi z normalnim tkivom prostate, vendar se je število teh celic zniževalo z napredovanjem bolezni. Nižja pozitivna SR-A1 celična gostota je bila povezana z napredovanim stadijem bolezni. Akumulacija pozitivnih celic SR-A1 v PIN lezijah je kazala na vlogo SR-A1 v antigen predstavitvenem celičnem odgovoru na zgodnjo malignost. Verjetno je bila aktivnost APC v začetku visoka, pri progresiji pa se je število in s tem zaščitna vloga makrofagov in dendritičnih celic zmanjšala, kar je morda olajšalo nadaljnjo rast in razvoj tumorja.

Na zaščitno vlogo SR-A1 pri raku kaže alelna delecija na kromosomu 8p21-25, ki je pogost dogodek v karcinogenezi in razvoju različnih vrst rakov (rak prostate, dojk, črevesja, glave in vratu). Gen *msr1* je lociran na 8p22 in deluje v mnogih procesih, vlogo ima tudi kot tumor-supresorski gen pri karcinogenezi prostate (Xu in sod., 2002).

Protitumorsko je SR-A1 deloval tudi v študiji, kjer so preučevali vpliv LPS-a na SR-A1. Izkazalo se je, da je LPS preko p38 povzročil izražanje gena za SR-A1. Prekomerno izražanje gena za SR-A1 je utišalo sproščanje TNF- α in aktivacijo nuklearnega faktorja kappa B (NF- κ B). LPS sproženo izražanje SR-A1 so utišali s specifičnim inhibitorjem p38 in ne z inhibicijo signalizacije Tollu-podobnih receptorjev 4 (ang. Toll-like receptor 4; TLR4), kar je dokaz, da LPS zviša izražanje SR-A1 preko p38 in ne preko TLR4. Rezultati torej kažejo, da SR-A1 zmanjša imunski odziv, saj zniža izločanje TNF- α , prav ta snov pa omogoča širjenje tumorja preko zvišanega izražanja matriksnih metaloproteinaz (Xiang in sod., 2009).

V študiji iz istega leta (2009) so Jin in sodelavci preučevali periferne krvne dendritične celice (ang. peripheral blood dendritic cells; PBCDs) in iz monocitov izviraajoče dendritične celice (ang. monocyte derived dendritic cells; MDDCs), na katerih se izražajo SR-A1 in SR-A2. Tretiranje dendritičnih celic s fukoidanom, SR-A agonistom, ali protitelesi anti-SR-A je občutno povečalo površinsko izražanje kostimulatorne molekule CD83 in človeških levkocitnih antigenov II (ang. human leukocyte antigens; HLAII) na PBCDs. S fukoidanom tretirane celice so celo producirale TNF- α , ne pa tudi interleukina-12 (IL12). Če so pred tem tretirali z nevtralizirajočimi protitelesi TNF- α , do s fukoidanom inducirane dozorevanja ni prišlo. V kokulturi celic T s fukoidanom-zorenimi PBCDs je bilo izboljšano izločanje interferon-game (IFN- γ) in proliferacija celic T. Ko so inhibirali

p38 mitogen aktivirano proteinsko-kinazo (ang. p38 mitogen-activated protein-kinase; p38 MAPK) in glikogen-sintazo-kinazo-3 β (ang. glycogen-synthase-kinase-3 β ; GSK-3 β), so s tem utišali produkcijo TNF- α in zorenje s fukoidanom tretiranih PBCDs. Pri MDDCs z utišanim genom za SR-A v prisotnosti fukoidana ni prišlo do povečane regulacije izražanja CD83, produkcije TNF- α in fosforilacije p38 MAPK ter GSK-3 β . Rezultati kažejo, da ligacija SR-A vodi v nastajanje TNF- α , kar posledično povzroči dozorevanje PBCDs in to vodi v izboljšano T celično stimulatorno kapaciteto. Iz teh rezultatov lahko SR-A dodelimo zaščitno vlogo, saj ojača imunski odziv, vendar pa podatek, da višje izražanje gena za SR-A vodi v boljše izražanje TNF- α , kaže na protumorsko vlogo, obenem pa je v nasprotju s podatki raziskave Xianga in sodelavcev (2009).

2.1.2 Protumorska vloga

SR-A1 se primarno izraža na celicah pridobljenega imunskega sistema (makrofagi in dendritične celice) in deluje kot vzorčno prepoznavni receptor (ang. pattern recognition receptor; PRR), odkrili pa so tudi, da je receptor na antigen predstavitvenih celicah (APC) za proteine vročinskega šoka (ang. heat shock protein; HSP) (Berwin in sod., 2003).

Wang in sodelavci so leta 2007 ugotovili, da pomanjkanje SR-A1 pomembno izboljša HSP ali LPS posredovano vakcinsko aktivnost proti slabo imunogenim tumorjem, kar kaže na to, da SR-A1 ublaži imunostimulatorni efekt adjuvansov ali »nevarnih« molekul. Izboljšan antitumorski odgovor v miših z izbitim genom za SR-A1 je bil povezan s povečanim antigen specifičnim odgovorom celic T. Pomanjkanje SR-A1 dendritičnih celic je pomenilo večji odziv na vnetne dražljaje in je predstavljalo bolj učinkovito antigen predstavitveno sposobnost v primerjavi z divjim tipom celic. To je dokaz, da SR-A1 negativno uravnava antigen specifično antitumorsko imunost, kar je pomembna klinična implikacija pri oblikovanju cepiv za imunoterapijo raka. Z raziskavami so tako dokazali, da odsotnost SR-A1 lahko celo vrne imunogenost slabo imunogenih tumorjev in pomembno izboljša antitumorsko učinkovitost cepiv z uporabo agonistov TLR kot adjuvansov. Ker ima SR-A1 pomembno vlogo v regulaciji antigen predstavitvene sposobnosti APC, s tem vpliva tudi na odziv citotoksičnih celic T (ang. cytotoxic T lymphocytes; CTL) in antitumorsko imunost.

Dve leti kasneje (2009) so Yi in sodelavci domneve kolegov še dodatno potrdili. V primeru odsotnosti SR-A1 na dendritičnih celicah, je to spodbujalo delovanje agonistov za receptorje TLR, zvečalo aktivacijo T celic CD8⁺ in s tem je bila zvišana tumorska zaščitna imunost, obenem pa izboljšano zaviranje tumorske rasti. Dendritične celice brez SR-A1 so kazale bolj učinkovito imunostimulatorno aktivnost preko TLR4 kot divji tip celic. To je pomemben rezultat za oblikovanje cepiv, saj je v odsotnosti SR-A1 lahko vakcinacija proti slabo imunogenim tumorjem zelo uspešna, v nasprotnem primeru pa SR-A1 celo zniža adjuvantni učinek eksogenih nevarnih spojin (npr. LPS).

Čeprav je znano, da določeni endocitotski receptorji lahko predstavljajo dvojno funkcijo, presnovo ligandov in sprožitev signalnih transdukcijskih kaskad, molekularni mehanizem, s katerim SR-A1 modulira aktivacijsko signalno pot TLR, ostaja neznan. Predvidevajo, da aktivacija TLR4 vpliva na privzem antigenov in predstavitev z APC, kar se kaže s prehodno zvišanim izražanjem genov za endocitne receptorje, vključno s SR-A1. Ti spreminjajo posledice aktivacije TLR4, kar direktno ali indirektno vodi v zmanjšano

izločanje vnetnih signalov.

SR-A1 tudi zavre sintezo IL12, ki se sprošča iz makrofagov po stimulaciji z LPS (Sutterwala in sod., 1997). To vpliva na slabši imunski odgovor, saj je IL12 vključen v diferenciacijo naivnih T celic v Th0 celice, ki se kasneje razvijejo v Th1 ali Th2 celice, stimulira pa tudi produkcijo IFN- γ in TNF- α iz celic T ter celic naravnih ubijalk (Trinchieri, 2003).

V eni izmed raziskav so proučevali imunosupresivne levkocite, ki predstavljajo kritični faktor pri progresiji tumorja. Tumorsko mikrookolje te levkocite spremeni tako, da utišajo imunski odgovor, olajšajo metastaziranje in pomagajo pri ožiljanju. Predominantna vrsta supresivnih levkocitov, ki so jih našli v človeškem in mišjem ovarijskem tumorju, se imenuje vaskularni levkociti (VLC), ker so kazali funkcije in celične označevalce dendritičnih in endotelijskih celic. Uporabili so ID8 mišji model; ID8 ovarijska tumorska celična linija izhaja iz mišjih ovarijskih epitelnih celic. V študiji so hoteli preveriti učinkovitost zmanjšanja števila VLC kot tumorska terapija. Tekom študije so odkrili SR-A1, kot celični površinski receptor, ki se specifično izraža na VLC človeškega in mišjega ovarijskega tumorja. Z dodatkom anti SR-A1 imunotoksina jim je uspelo inhibirati peritonealno širjenje tumorja. Toksin se je moral vezati na SR-A1, kajti pri miših, ki so prejele netarčni toksin ni prišlo do inhibicije rasti tumorja. SR-A1 tako predstavlja novo in specifično tarčo za učinkovito imunoterapevtsko zdravljenje peritonealnega tumorja ovarija (Bak in sod., 2007).

Protumorsko vlogo SR-A1 so odkrili tudi v študiji, kjer so ugotovili, da ovarijske rakave celice spremenijo kokultiviranim makrofagom fenotip, ki postane podoben makrofagom, najdenim v ovarijskem tumorju. Tumorske celice so povzročile dinamične spremembe v mRNA genov za makrofagne citokine, kemokine, in matriksne metaloproteinaze, ki so jih našli v raku človeka. Prav tako je bila pri kokultivaciji zvišana regulacija makrofagne manoze, manoznega receptorja in SR-A1. Da bi ugotovitev še dodatno potrdili, so preučevali regulacijo SR-A1 na tumorske makrofage (ang. tumor associated macrophages; TAM) *in vitro* in *in vivo*. V kokulturi mišjih makrofagov, brez TNF- α ali njenih receptorjev, so odkrili, da je TNF- α preko receptorja p75 najpomembnejši za sprožitev nastanka SR-A1. Kajti v TAM iz ovarijskega raka, tretiranimi s protitelesi proti TNF- α ali v miših z izbitim genom za TNF- α , je bilo izražanje SR-A1 znižano (Hagemann in sod., 2006).

Da ima SR-A1 visoko izražanje v TAM, so ugotovili tudi v tej študiji, v kateri so divjemu tipu miši in mišim brez SR-A1 vbrizgali celice EL4. Čeprav se ti dve skupini miši nista razlikovali v številu infiltriranih makrofagov in limfocitov ter v neovaskularizaciji, so miši brez SR-A1 zaostale v rasti tumorja EL4. V tumorskem tkivu teh miši se je povečalo izražanje mRNA inducibilne dušikovo oksidne sintaze (ang. nitric oxide synthase; NOS) in INF- γ . Zmanjšano število nekrotičnih celic EL4 je preko kultiviranih makrofagov povzročilo višjo produkcijo NO in INF- γ . Produkcija NO in INF- γ se je povečala tudi v makrofagih miših z izbitim genom za SR-A1 *in vitro*. Prav tako je bila v teh makrofagih zvečana produkcija IFN- β . Rezultati so pokazali, da je bila antitumorska aktivnost makrofagov zvišana v miših z izbitim genom za SR-A1 zaradi zvišane produkcije NO in INF- γ (Komohoara in sod., 2009).

Znano je, da imajo TAM immunosupresivni M2 fenotip. S produkcijo različnih mediatorjev sodelujejo pri tumorski rasti, invaziji in metastaziranju. Makrofagi, še posebno M2 polarizirani makrofagi, izražajo CD163 in SR-A1. Namen te študije je bil predstaviti rezultate diferenciacije makrofagov v humanih ovarijskih seroznih in mucinskih epitelijskih tumorjih. Metoda je temeljila na imunohistokemičnih rezinah. Skoraj vsi makrofagi, ki so prešli v tumorska tkiva, so izražali CD163 in SR-A1, nakazujoč fenotipski premik proti M2 makrofagom. Število makrofagov CD68 in prav tako CD163 in SR-A1 je bilo v mejnih in malignih tumorjih višje kot v benignih tumorjih. Makrofagne kolonije spodbujajoči faktor 1 (ang. macrophage colony-stimulating factor 1; M-CSF-1), eden od citokinov, ki povzroči polarizacijo TAM proti M2 fenotipu, je bil povišan. Izražanje CSF-1 v malignih tumorskih celicah je bilo precej višje od te v benignih tumorskih celicah in je koreliralo s histološko malignostjo. Rezultati dokazujejo, da CSF-1, izhajajoč iz tumorskega tkiva, povzroči premik makrofagov proti M2 fenotipu, ki je znan, da pomaga pri tumorski rasti (Kawamura in sod., 2009).

2.1.3 Nepojasnjena vloga

V sledečih študijah niso našli nobene povezave med SR-A1 in rakom. V eni izmed njih so pri moških z rakom prostate identificirali različne mutacije v genu *msr1*, predvsem so se osredotočili na mutacijo 999C>T (Xu in sod., 2002). Uporabili so veliko kontrolno skupino in družine z rakom prostate. Test na to mutacijo so opravili pri 2943 moških z invazivnim karcinomom prostate. Rezultati analize, pridobljeni iz velikega števila primerov iz različnih držav, so pokazali, da mutacija 999C>T ni povezana s povečanim tveganjem za nastanek raka prostate (Hope in sod., 2005).

Chen in sodelavci so leta 2008 ugotavljali povezavo med genetskim polimorfizmom gena *msr1* in tveganjem za nastanek raka prostate pri zdravih posameznikih. Znano je, da je gen za SR-A1 udeležen pri kroničnem vnetju, ki je eden od faktorjev za raka prostate. Postavili so hipotezo, da so sekvenčne variacije gena za SR-A1 povezane s tveganjem za raka prostate. V študijo so vključili 1400 moških, polovico z rakom prostate ter polovico zdravih. Genotipizirali so tri glavne polimorfizme posameznih nukleotidov (ang. single nucleotide polymorphisms; SNP), ki so bili znani, da so povezani s tveganjem za nastanek te vrste raka. Po dobljenih rezultatih so potrdili, da nobeden od teh SR-A1 SNP-jev niti ocenjeni haplotipi niso bili povezani s tveganjem za raka prostate, prav tako niso bili povezani z višjim ali napredovanim stadijem raka prostate.

Ugotovili so, da je alelna delecija kromosoma na mestu 8p-21-25 pogost dogodek pri razvoju različnih vrst rakov, zato so preverili, če na nastanek pljučnega raka tudi vplivajo mutacije. Da bi olajšali raziskavo sprememb gena za SR-A1, ki je lociran na 8p22, in da bi določili vlogo tega gena v karcinogenezi in tumorskem napredovanju, so določili intronske prajmerje primerne za podvojitev kodirane regije. Ker je bila pogosta delecija 8p-21-23 že prej večkrat omenjena v primeru raku pljuč, so iskali mutacije povsod v kodirajoči regiji gena *msr1* v vzorcu genomske DNA. Metoda je vključevala verižno reakcijo s polimerazo ter analizo konformacijskih polimorfizmov enoverižnih DNA (ang. polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism; PCR-SSCP) in direktno DNA sekvenciranje. Nukleotidne različice gena *msr1* so odkrili v samo enem primeru od 30. V tem primeru so našli 6bp delecijo in substitucijo timina v citozin znotraj introna 7. Delecija 6-bp je bila locirana na DNA mikrosatelitni regiji, substitucija timina v citozin je izgledala

kot polimorfizem. Rezultati so pokazali, da gen *msr1* večinoma ni mutiran v primeru raka pljuč (Yoshimura in sod., 2004).

3 MATERIAL IN METODE

V študiji je sodelovalo 42 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom v stadiju I, II in III. Kirurgi so vzorce pljučnega rakavega tkiva in sosednjih navidezno zdravih tkiv odvzeli najkasneje v 15 minutah po resekciji pljuč. Tumorsko tkivo so odvzeli na periferiji tumorja, torej v območju največje rasti, normalno tkivo, ki so ga odvzeli vsakemu bolniku in je predstavljalo kontrolno tkivo, pa je bilo odvzeto na periferiji pljuč, daleč proč od tumorja. Vzorce tkiv so do analize shranili v tekočem dušiku. Stadiji so bili določeni po TNM klasifikaciji (Sobin in Wittekind, 2002). Histološke analize tumorskih tkivnih vzorcev so po histološki klasifikaciji WHO izvedli na Medicinski fakulteti v Ljubljani (Travis in sod., 2004). Študijo je odobrila nacionalna etična komisija, dovoljenje so dobili tudi od vseh študijskih udeležencev.

Paciente so opazovali 4 leta. Prvi 2 leti so paciente pregledovali vsake 3 mesece, ostali dve leti pa vsakih 6 mesecev. Klinični status in rezultati rentgenskega slikanja so bili podani v času preiskave. V primeru suma na napredovanje bolezni so opravili bronhoskopijo in računalniško tomografijo (computed tomography; CT). Pacienti v stadiju III so bili postoperativno zdravljeni tudi s kemoterapijo.

Operacije, pregledi in zdravljenje bolnikov so potekali na Kliničnem oddelku za torakalno kirurgijo, Kirurške klinike, Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Droben laboratorijski material

- Pinceta;
- terilnica;
- mikroepruvete;
- pipete;
- nastavki za pipete;
- stojalo za mikroepruvete;
- stojalo za mikroepruvete, prilagojeno za v zamrzovalno skrinjo;
- mikrocentrifugirke;
- plošča s 96 vdolbinicami;
- prozorna folija.

3.1.2 Aparature

- Avtomatske pipete;
- digestorij;
- tehtnica;
- stresalnik epruвет;
- hladilnik;
- zamrzovalna skrinja;
- posoda s tekočim dušikom;
- aparat za pretvorbo mRNA v cDNA;

- aparat za PCR.

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija RNA iz vzorcev tumorskih in kontrolnih pljučnih tkiv bolnikov

Najprej smo izolirali RNA iz vzorcev pljuč 42 bolnikov z nedrobnoceličnim rakom ter iz vzorca, ki nam je služil kot interni standard. Interni standard nam omogoča postavitve praga občutljivosti v različnih serijah meritev na isti nivo. S tem zmanjšamo medserijsko neponovljivost, ki je posledica različnega delovanja analizatorja zaradi zunanjih vplivov, pa tudi zaradi različne umeritve detektorja fluorescenčne svetlobe med posameznimi serijami meritev.

Za izolacijo mRNA smo uporabili komplet RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Postopek smo opravili po protokolu proizvajalca in je bil sledeč:

1. Košček zamrznjenega tkiva smo iz zamrzovalne stekleničke prenesli v terilnico in ga v tekočem dušiku razgradili v zelo majhne delce.
2. Delno homogenizirano tkivo smo stehali in prenesli v epruveto z 1 ml pufra RLT Plus ter 10 μ l β -merkaptetoanola (β -ME) (pufer RLT lizira celice, β -ME v njem pa denaturira RNaze).
3. Tkivo smo nato homogenizirali z ultrazvokom dokler mešanica ni postala motna.

Delo smo nadaljevali v komori, ki smo jo najprej ustrezno očistili in pripravili. Vkllopili smo UV luč, najprej 30 min, nato še 5 min. Za čiščenje komore smo uporabili 70-odstotni etanol, jo dodatno razkužili s 6-odstotnim vodikovim peroksidom, stojala in pipete pa smo razkužili s 3-odstotnim hipokloritom.

3.2.2 Izolacija RNA iz homogenata z ionsko izmenjevalno kromatografijo

1. Lizat smo centrifugirali 3 min pri 16000 x g. S pipetiranjem smo pazljivo odstranili supernatant in ga 600 μ l prenesli na kolono za odstranitev DNA, nameščeno v 2 ml-zbiralno epruveto. Centrifugirali smo 30 s pri 8000 x g, odvrkli kolono in shranili eluat v zbiralni epruveti (v tem koraku smo odstranili genomsko DNA, saj se je vezala na kolono).
2. Eluatu smo dodali 1 volumen (350 μ l ali 600 μ l) 70-odstotnega etanola in dobro zmešali s pipetiranjem.
3. Prenesli smo do 700 μ l vzorca na kolono za izolacijo RNA, nameščeno v 2 ml-zbiralno epruveto in centrifugirali 15 s pri 8000 x g. Eluat smo zavrgli, kajti vsa RNA se je vezala na filter na koloni.
4. Dodali smo 700 μ l pufra RW1 na kolono za izolacijo RNA in ponovno centrifugirali 15 s pri 8000 x g, da smo sprali moteče snovi in očistili RNA, ki je ostala vezana na membrano. Zavrgli smo eluat.
5. Dodali smo 500 μ l pufra RPE na kolono in ponovili postopek v prejšnji točki.
6. Dodali smo 500 μ l pufra RPE in centrifugirali 2 min pri 8000 x g.
7. Kolono za izolacijo RNA smo prenesli v novo 2 ml-epruveto in zavrgli staro zbiralno epruveto z eluatom. Centrifugirali smo pri 16000 x g 1 min.
8. Kolono za izolacijo RNA smo prenesli v novo 1,5 ml-epruveto. Dodali smo 30-50

μl vode brez RNaz na membrano kolone. Centrifugirali smo 1 min pri 8000 x g, da smo eluirali RNA.

9. Postopek spiranja smo ponovili z nanosom dodatne vode brez RNaz (30-50 μl). Vzorce RNA smo shranili pri -80°C.

3.2.3 Reverzna transkripcija

Z uporabo encima reverzna transkriptaza prepisemo RNA v stabilnejšo, komplementarno cDNA, ki jo nato kot matrico uporabimo v reakciji PCR. Reverzna transkriptaza je od RNA odvisna DNA-polimeraza, ki enoverižno RNA prepisuje v enoverižno DNA. Encim ima dvojno aktivnost, in sicer DNA-polimerazno aktivnost ter ribonukleazno aktivnost (razgradnja RNA po prepisu v cDNA). Obratno prepisovanje lahko poteka z naključnimi začetnimi oligonukleotidi, oligo (dT) začetniki ali gensko specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Izolirani mRNA se doda poliT začetni oligonukleotid ter reverzno transkriptazo in ostale začetne oligonukleotide, ki jih reverzna transkriptaza pripenja na novo sintetizirano cDNA. PCR v realnem času, združen z obratnim prepisovanjem je trenutno najbolj občutljiva tehnika za detekcijo in kvantifikacijo mRNA. (Valasek in Repa, 2005)

Za prepis mRNA v cDNA smo uporabili High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster city, CA). Reakcijska mešanica je vsebovala:

Preglednica št. 4: Sestavine in njihovi volumni potrebni za potek reverzne transkripcije

Sestavine	Volumen (μL)
10 X reverzno transkripcijski pufer	10
25 X dNTPs	4
10 X naključni začetni oligonukleotidi	10
reverzna transkriptaza, 50 U/μL	5
voda brez nukleaz	21
RNA inhibitor	5

dNTP-ang.deoxyribonucleotide triphosphate; deoksiribonukleotid trifosfati: dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Reakcijsko mešanico smo inkubirali:

- 10 min pri 25°C,
- 120 min pri 37°C
- 5 minut pri 95°C

v GeneAmp PCR System 9700 termičnem pretvorniku za reverzno transkripcijo.

3.2.4 PCR v realnem času

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času predstavlja nadgradnjo konvencionalnega PCR. Sinonim zanj je kinetični ali kvantitativni PCR, ker omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med reakcijo. Pomnoževanje in detekcija potekata sočasno in temeljita na merjenju fluorescence. Metoda PCR v realnem času tako omogoča merjenje nastalega produkta v eksponentni fazi PCR reakcije. V tej fazi prav tako določimo prazno fluorescenco, ki predstavlja odziv, kjer je intenziteta odziva značilno višja od ozadja. Cikel,

v katerem vzorec preide to mejo, imenujemo Ct-cikel (Slanc, 2007).

Pri tej metodi smo torej v nasprotju z običajnim PCR dodali še fluorescenčno sondo karboksilfluorescein (FAM), specifično za gen *msr1*. Ta je bila ob vsaki pomnožitvi tarčnega segmenta razgrajena in je tako oddala fluorescentni signal, ki ga je zaznal ciklični termostat za PCR v realnem času. Večja količina RNA v začetnem vzorcu, je pomenila tudi več cDNA in njenih pomnožitev in s tem večji fluorescentni signal. Pri vsaki reakciji smo pomnoževali tudi DNA hišnega gena, za katerega je značilno, da se vedno izraža, neodvisno od zdravstvenega stanja preiskovanca. Z metodo PCR v realnem času smo merili, v katerem ciklu doseže reakcija z genom za SR-A1 prazno fluorescenco. Ko fluorescenčni signal barvila doseže prazno stopnjo, to lahko povežemo s količino tarčne sekvence, kar omogoči kvantifikacijo DNA. Vrednost Ct je obratno sorazmerna začetni količini tarčne cDNA in jo lahko uporabimo za izračun absolutne (dejansko število kopij cDNA v vzorcu-absolutna kvantifikacija) ali relativne količine (razliko v izražanju gena med dvema vzorcema-relativna kvantifikacija) cDNA določenega pomnožka. (Baebler, 2006)

Postopek :

1. Priprava potrebnih mešanic in reagentov: v komori smo pripravili master mix (MM), ki so ga sestavljali:

Preglednica št. 5: Sestavine in njihovi volumni za master mix, potreben pri PCR v realnem času

Sestavine	Volumen (μL)
TaqManUniversal PCR MM (Applied biosystems)	10 μl
avtoklavirana voda	8 μl
TaqManGene (Applied biosystems)-detektor za SR-A1 (oligonukleotidni začetniki in sonda)	1 μl

Poleg MM smo pripravili še:

Preglednica št. 6: Sestavine in njihovi volumni, ki so poleg master mixa še potrebni pri PCR v realnem času (količine so za eno reakcijo, za vse reakcije so bile količine ustrezno višje)

Sestavine	Volumen (μL)
Avtoklavirana voda	1 μl
cDNA vzorec tumorskih in kontrolnih tkiv bolnikov	1 μl
cDNA vzorec internega standarda	1 μl

2. Priprava plošče: pripravili smo ploščo s 96 luknjicami. V prvi dve luknjici smo nanесли 1 μl vode in 19 μl MM, to je bila slepa proba. Nato smo nadaljevali v drugi vrsti, kjer smo v treh ponovitvah nanašali vzorce cDNA enega tumorja (1 μl) in 19 μl MM, v naslednjih 3 luknjicah smo nanесли prav tako v treh ponovitvah cDNA kontrolnega tkiva istega bolnika (1μl) in 19 μl MM. Nadaljevali smo dokler nismo zapolnili plošče do konca predzadnje vrste. V zadnji vrsti smo v zadnje tri luknjice nanесли 1 μl cDNA internega standarda in zopet 19 μl MM. Tako smo pripravili vse potrebne plošče, da smo zaobjeli vzorce vseh 42 bolnikov.

3. Pomnoževanje: plošče smo prelepili s samolepljivo prosojno folijo, dali na vorteks, nato pa še centrifugirali 2 min. V primeru, da so bili po 2-min prisotni mehurčki, smo dali še enkrat v centrifugo. cDNA smo pomnoževali v cikličnem termostatu za PCR v realnem času (ABI PRISM SDS 7000) po naslednjem programu:
 - začetna denaturacija vzorca:
 - 50°C; 2 min; 1 cikel
 - 95°C; 10 min; 1 cikel
 - pomnoževanje:
 - 95°C; 15 s-denaturacija; 40 ciklov
 - 60°C; 1 min; prileganje začetnih oligonukleotidov, pomnoževanje

3.2.5 Analiza rezultatov

Za analizo podatkov smo uporabljali računalniški program 7000 System SDS Software. Program je izračunal vrednost Ct glede na izmerjeni fluorescenčni signal in nastavljeno bazno linijo ter prag. Vrednosti smo prenesli v program Microsoft Excel in izračunali povprečne vrednosti Ct. Izražanje tarčnega gena SR-A smo normalizirali na izražanje hišnega gena GUS. Hišni gen je bil določen že prej in sicer s TaqMan Human Endogenous Control Plate (Applied Biosystems) po navodilih proizvajalca. V 4 parih tkiv (tumorska in netumorska), ki smo jih prevedli v cDNA in jim izmerili Ct cikle, smo ocenili izražanje 11 genov. Izbor hišnega gena je temeljil na najmanjšem geometričnem povprečju Ct cikla posameznih kandidatov in je rezultiral iz geNorm (Trošt in sod., 2009). Poiskali smo tistega, ki se je najbolje izražal v vseh tkivih vseh bolnikov in je bil neodvisen od bolezni oz. tumorja. Hišni gen se namreč vedno enako izraža ne glede na bolezen; razlike med vzorci pa so posledica razlik izolacije mRNA iz tkiva, uspešnosti izolacije, variabilnosti tkiva za izolacijo,...

Predpostavko primerljive PCR učinkovitosti smo preverili z dilucijsko krivuljno metodo. Pozitivni rezultati so dovoljevali uporabo komparativne metode. S primerjalno Ct metodo smo primerjali vrednosti Ct vzorcev, ki so nas zanimala, z vrednostmi Ct v kontrolnem ali kalibratorskem vzorcu (npr. neobdelani vzorci, normalno tkivo). Povprečno PCR amplifikacijsko učinkovitost za SR-A1 in GUS smo dobili z izračunom relativne količine mRNA za SR-A1 z uporabo enačbe

$$RQ = (1+E) \exp(-\Delta\Delta Ct) \quad \dots (1)$$

RQ: relativna količina, E: učinkovitost amplifikacije, Ct: prazen cikel, $\Delta\Delta Ct$: ΔCt gena SR-A1 – ΔCt gena GUS

3.2.6 Statistična analiza

Rezultati so predstavljeni kot mediana s 25 in 75 percentilom in povprečnimi vrednostmi. Primerjave parametrov med tumorskimi in kontrolnimi tkivi smo naredili z Wilcoxonovim

testom. Mann-Whitneyjev, Kruskal-Wallisov, Fisherjev ali Pearsonov χ^2 test smo uporabili za primerjave enakih parametrov med skupinami. Povezave med variabilnostmi smo ocenili s Spearmanovim redom ali regresijsko analizo. Uni- ali multivariantna Coxova regresijsko analizo smo uporabili za oceno prognostičnega pomena opazovanih parametrov. Statistično analizo smo izvedli z SPSS v.15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL); $p < 0,05$ smo obravnavali kot statistično pomembno.

4 REZULTATI

Preglednica št. 7: Rezultati meritev Ct tarčnega gena *msr1*, hišnega gena *gus*, normalizacija SR-A1 ter razmerje SR-A1 kontrolnega in tumorskega tkiva

Vzorec	Plošča	SR-A1		GUS		Normalizacija SR-A1			SR-A1 K/T
		K	T	K	T	K	T	T/K	
1	4	23,19	24,99	27,52	26,46	-4,33	-1,47	2,86	7,24
2	4	22,61	23,01	26,94	26,07	-4,33	-3,06	1,27	2,41
3	4	23,26	21,99	25,69	23,94	-2,43	-1,95	0,47	1,39
4	4	21,58	24,39	26,26	24,85	-4,68	-0,46	4,22	18,64
6	4	22,16	24,51	25,46	26,03	-3,30	-1,51	1,79	3,45
8	4	22,23	24,50	25,59	25,62	-3,36	-1,12	2,25	4,75
9	4	21,27	22,68	25,76	25,45	-4,49	-2,77	1,72	3,29
10	4	22,86	20,55	25,95	25,13	-3,09	-4,58	-1,49	0,36
11	5	22,23	22,33	26,40	25,72	-4,17	-3,39	0,78	1,72
12	5	22,00	23,08	25,82	26,47	-3,82	-3,39	0,43	1,35
13	5	22,58	23,54	26,38	26,17	-3,80	-2,63	1,17	2,25
14	5	22,68	24,52	25,85	26,57	-3,17	-2,05	1,12	2,18
16	5	21,67	24,04	25,56	26,29	-3,88	-2,25	1,64	3,11
17	5	22,29	23,28	26,54	26,88	-4,25	-3,60	0,65	1,57
18	5	23,05	21,41	25,77	25,20	-2,73	-3,79	-1,06	0,48
19	5	20,75	22,90	25,03	25,10	-4,28	-2,20	2,08	4,23
20	3	22,78	24,04	25,39	26,06	-2,60	-2,02	0,59	1,50
22	3	22,32	23,16	26,42	26,64	-4,10	-3,47	0,63	1,54
23	3	25,67	23,23	25,79	25,07	-0,12	-1,84	-1,72	0,30
25	3	21,79	22,53	27,31	26,29	-5,52	-3,76	1,76	3,39
26	2	22,70	27,18	26,21	26,15	-3,51	1,04	4,54	23,29
27	2	22,48	23,41	26,54	25,91	-4,06	-2,50	1,56	2,94
28	2	23,45	25,20	25,97	27,46	-2,52	-2,26	0,26	1,20
29	2	20,62	23,14	25,44	25,35	-4,82	-2,21	2,61	6,09
30	*	27,83	23,78	26,78	27,24	1,05	-3,46	-4,51	0,04
31	2	22,30	24,71	25,17	26,03	-2,87	-1,32	1,55	2,92
32	6	25,75	26,13	25,04	26,40	0,71	-0,27	-0,98	0,51
33	6	26,77	25,02	25,67	26,48	1,10	-1,46	-2,56	0,17
34	6	22,48	23,81	26,04	26,41	-3,57	-2,60	0,97	1,95
35	6	25,41	23,64	26,38	25,41	-0,97	-1,77	-0,80	0,57
37	6	25,70	23,48	24,85	25,04	0,86	-1,56	-2,41	0,19
38	2	22,76	23,44	24,97	25,35	-2,20	-1,91	0,29	1,23
39	2	21,89	23,34	25,93	26,72	-4,04	-3,37	0,67	1,59
40	2	22,72	26,02	25,72	26,72	-2,99	-0,70	2,30	4,91
41	6	23,80	28,12	25,23	26,77	-1,43	1,35	2,79	6,90
42	6	22,14	26,10	26,48	26,17	-4,33	-0,07	4,27	19,25
43	7	24,26	23,50	24,35	25,74	-0,08	-2,24	-2,16	0,22
45	7	23,10	24,41	26,53	25,39	-3,43	-0,98	2,45	5,46
46	7	24,30	23,77	26,14	25,72	-1,85	-1,95	-0,10	0,93
47	7	25,95	25,57	25,88	24,91	0,07	0,66	0,59	1,51
48	7	25,25	25,38	25,67	26,20	-0,42	-0,82	-0,40	0,76
49	7	25,84	22,99	24,70	25,22	1,13	-2,23	-3,37	0,10
Povprečje		23,28	23,96	25,85	25,91	-2,56	-1,95	0,62	3,44
Standardni odklon		1,67	1,45	0,71	0,72	1,92	1,31	2,01	5,09

K-kontrolno tkivo;
 T-tumorsko tkivo;
 SR-A1-receptor
 čistilec A1;
 GUS- β
 glukoronidaza;
 T/K-razmerje
 tumorsko/kontrolno
 tkivo;
 K/T-razmerje
 kontrolno/tumorsko
 tkivo;
 * ni statistično
 analiziran

Preglednica št. 8: Klinične značilnosti in laboratorijski rezultati bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom

Parameter	Podatki
Število	41
Spol (ženske/moški)	11/30
Starost (leta)	63,0 (53,0/67,0) (44-77)
BMI (kg/m ²)	24,8 (22,2/28,3) (16,4-46,5)
Izguba teže v zadnjih treh mesecih (da/ne)	24/17
Kadilec (nikoli/trenutni ali bivši)	5/36
Stadij bolezni (I-III)*	17/14/10
Histološki tip tumorja (ploščatocelični/žlezni/velikocelični/drugi)	19/13/5/4

Vrednosti so predstavljene kot mediana (25-percentil/75-percentil) in povprečne vrednosti

BMI, body mass index

* po TNM klasifikaciji (Sobin in Wittekind, 2002)

Med 4 letnim spremljanjem bolnikov jih je 21 umrlo zaradi napredovanja bolezni, 20 jih je bilo po 4 letih še živih, 1 bolnik je umrl zaradi nerakavih razlogov, zato smo ga iz statistične analize izključili. V raziskavi so sodelovali pretežno moški, bilo jih je 30, žensk pa samo 11. Njihova starost je bila v povprečju 63 let. Povprečen indeks telesne teže je bil 24,8, kar je tik pod mejo, da bi lahko udeležence študije označili kot čezmerno prehranjene oz. jim pripisali debelost 1. stopnje, kajti indeks telesne teže je razmerje med telesno težo in kvadratom višine in je dober pokazatelj ocene debelosti in s tem dejavnikov tveganja za razvoj nekaterih bolezni. Težo je v zadnjih mesecih izgubilo 24 udeležencev, kar je bilo verjetno povezano z napredovanjem bolezni. Pomemben podatek je, da so bili skoraj vsi bolniki kadilci, le 5 je bilo takih, ki niso nikoli kadili. To se ujema z dejstvom, da je kajenje dejavnik tveganja za nastanek pljučnega raka. V študijo smo vzeli bolnike s stadijem od I do III, $\frac{3}{4}$ jih je bilo na začetku bolezni, torej v stadiju I ali II. Pri pregledu histološkega tipa tumorja je prevladoval ploščatocelični rak, kar je zanimivo, saj je ta tip po pojavnosti šele na drugem mestu; najpogostejši je žlezni rak, ki je bil v našem primeru za ploščatoceličnim, sledil je velikocelični ter druge oblike raka.

Po opravljeni statistični analizi smo dobili rezultate. Prvi izmed dobljenih rezultatov je bil v popolnem nasprotju z našo hipotezo, torej, da je v tumorskem tkivu izražanje gena za SR-A1 višje kot v kontrolnem tkivu. V našem primeru je bilo izražanje gena za SR-A1 višje v kontrolnem tkivu in to kar 2,2 krat. Ta rezultat smo dobili iz razmerja median kontrolnega (mediana=9,00) in tumorskega tkiva (mediana=4,05). $p=0,0004$.

Merili smo, če izražanje gena za SR-A1 v tumorskem tkivu korelira z izražanjem gena za SR-A1 v kontrolnem tkivu ($p=0,0037$, Pearsonov koeficient pa 0,4436) in korelacijo smo tudi potrdili.

Predvidevali smo, da bo z višjim stadijem bolezni višje tudi izražanje gena za SR-A1 v tumorskem tkivu, vendar se je izkazalo, da izražanje gena za SR-A1 v tumorskem tkivu ne korelira s stadijem bolezni.

Naši rezultati so tudi pokazali, da v tumorskem tkivu ni bilo razlike v izražanju gena za SR-A1 med ploščatoceličnim in žleznim histološkim tipom tumorja.

Pričakovali smo, da bomo pri bolnikih, ki so v obdobju 4-let po operaciji umrli, našli višje

izražanje gena za SR-A1 kot pri preživelih, vendar med preživelimi in umrlimi v tem pogledu ni bilo razlike.

Izražanje gena za SR-A1 v tumorskem tkivu tudi ni koreliralo s 4-letnim preživetjem bolnikov. Menili smo, da bodo bolniki z višjim izražanjem gena za SR-A1 prej umrli kot pa tisti z nižjim izražanjem za ta receptor.

Naše rezultate smo primerjali tudi z rezultati ostalih meritev narejenih v tkivih istih bolnikov v predhodnih raziskavah. Predvsem velja izpostaviti povezavo z izražanjem gena za LPL ter z aktivnostjo njegovega proteina v tumorskem tkivu. Ugotovili smo, da je izražanje gena za SR-A1 koreliralo z izražanjem gena za LPL (Pearsonov koeficient je bil 0,5548, $p=0,0002$), torej višje izražanje gena *msr1* je pomenilo tudi višje izražanje gena *lpl*.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Nekateri dobljeni rezultati so v nasprotju z našimi predvidevanji in kažejo na to, da bo potrebno še nadaljnje delo, da bomo znali razložiti naša opažanja. Določeni rezultati pa so lahko tudi posledica odsotnosti pacientov s IV. stadijem bolezni ter premajhne skupine preiskovancev. Možno je, da bi bili v primeru večje skupine ljudi in ustreznemu deležu bolnikov z najbolj napredovano obliko bolezni, dobljeni rezultati v območju naših pričakovanj.

Pričakovali smo, da bo izražanje gena za SR-A1 v tumorskem tkivu višje kot v kontrolnem tkivu, saj je SR-A1 receptor oxLDL-a, ta pa je vključen v presnovo lipidov (Kunjathoor in sod., 2002). S tem rakavo tkivo dodatno privzema proste maščobne kisline, lipide in lipoproteine, ki mu služijo kot celični gradniki, prekursorji pomembnih regulatornih spojin, obenem pa mu dajejo energijo za razvoj (Preiss-Landl, 2002). Ostale posledice zvišanega lipidnega privzema so: sprememba sestave membranskih fosfolipidov, kar vpliva na prepustnost in aktivnost receptorjev, neugoden hormonski metabolizem in zvečano nastajanje prostih radikalov kot posledica oksidacije maščobnih kislin; vse to pa pomaga pri tumorski rasti (Trošt in sod., 2009). Rezultati so pokazali nasprotno, izražanje gena za SR-A1 v kontrolnem tkivu je bilo višje kot izražanje v tumorskem tkivu. V primeru, da bi se potrdila naša hipoteza, bi to kazalo na protumorsko vlogo SR-A1.

Protumorsko vlogo so potrdili v mnogih študijah. V eni izmed njih se je izkazalo, da SR-A1 na APC zmanjša tumorski imunski odziv, ki ga povzroči delovanje agonistov za TLR4, obenem pa se zmanjša aktivacija limfocitov CD8⁺, kar olajša rast tumorja. V primeru, da so SR-A1 utišali, so APC bolje komunicirale z limfociti CD8⁺ in to je povečalo imunski odziv (Huanfa in sod., 2009).

Da je SR-A1 sposoben inhibirati signalno pot TLR4 in ima prav tako protumorsko vlogo se je pokazalo tudi, ko so mišim z izbitim genom za SR-A1 vbrizgali celice EL4; posledica tega je bila zmanjšana rast tumorja EL4. Če je bil SR-A1 prisoten, je inhibiral TLR4/IFN- β signalno pot, kar je vodilo v znižano regulacijo NO in produkcijo IFN- γ , to pa je omogočilo boljšo rast tumorja (Komohoara in sod., 2009).

V primeru preučevanja peritonealnega ovarijskega raka so uporabili mišji model ID8. Tu so našli VLC, ki so prilagojeni na tumor in pomagajo pri njegovi rasti ter izboljšajo ožiljanje in metastaziranje, obenem pa na svoji površini izražajo SR-A1. Prav preko tega receptorja so z uvedbo toksina skušali uničiti tumorske celice in to jim je uspelo, saj se je rast tumorja zmanjšala (Bak in sod., 2007).

V še eni študiji, kjer so preučevali tumor ovarijev, so našli M2 polarizirane makrofage, ki so izražali SR-A1 in CD163. Število makrofagov SR-A1 je bilo v mejnih in malignih tumorjih višje kot v benignih tumorjih. Zvišanje števila celic SR-A1 je sovpadalo s histološkim gradientom malignosti in izražanjem CSF-1, ki inducira polarizacijo TAM proti M2. Rezultati kažejo, da tumor izloča CSF-1, ki inducira makrofage, da se premaknejo proti M2 fenotipu, ki je značilen za tumor (Kawamura in sod., 2009).

Naši rezultati pa se trenutno bolje ujemajo z rezultati objav, ki kažejo, da ima SR-A1 zaščitno ali pa nobene vloge v rasti in razvoju tumorja. Rezultatu, da je izražanje gena za SR-A1 v netumorskem tkivu višje kot v tumorju, bi tako lahko dodelili zaščitno vlogo, kajti nižje izražanje gena za SR-A1 v tumorskem tkivu ne omogoča dodatnih nutrientov za razvoj tumorja in s tem se tumor ne more širiti.

Zaščitno funkcijo SR-A1 so prav tako dokazali v nekaterih primerih v preteklosti. V sledečem primeru bi lahko poiskali odgovor tudi na zgoraj omenjeni rezultat, da smo imeli nižje izražanje gena za SR-A1 v tumorskem tkivu, vendar smo preučevali le stadije I do III in ne zadnjega, IV. stadija, kjer bi se mogoče potrdila naša domnevanja, obenem pa smo ugotovili, da izražanje gena za SR-A1 v tumorskem tkivu ni povezano s stadijem bolezni; ne glede na to, v katerem stadiju so bili bolniki, se izražanje gena za SR-A1 ni bistveno razlikovalo. Logično bi bilo, da pri bolj razširjeni obliki raka tumorsko tkivo za svojo rast potrebuje več hrane, zato mora vedno bolj izražati SR-A1, ki mu omogoča stalen dotok hranilnih snovi, dobljenih iz maščob. V našem primeru pa npr. v stadiju III ni bilo nič višje izražanje gena za SR-A1 kot v stadiju I. Torej v primeru, v katerem lahko SR-A1 dodelimo zaščitno vlogo, so preučevali celično izražanje SR-A v človeškem tkivu prostate in ugotovili, da je v PIN lezijah zvišano število pozitivnih celic SR-A1, vendar se je z napredovanjem bolezni število teh celic zmanjšalo. Znižano izražanje gena za SR-A ob napredovanju bolezni razlagajo v povezavi z višjim kliničnim stanjem, večjim tumorjem. Bolniki z relativno nižjim številom SR-A1 pozitivnih APC so imeli več metastaz limfnih vozlov in so imeli manjšo možnost preživetja brez bolezni po operaciji. Znižanje števila pozitivnih celic SR-A1 tekom napredovanja bolezni je verjetno rezultat splošnega manjšega prehajanja makrofagov in dendritičnih celic v PIN lezije (Yang in sod., 2004).

Ugotovili so, da izražanje nekaterih SR-A uravnavajo določeni citokini. TGF- β 1, znan tudi kot imunski supresor, je sposoben specifično inhibirati SR-A1 v človeški makrofagni celični liniji THP-1 (Nishimura in sod., 1998). Tudi IL-6 ima v celicah THP-1 sposobnost inhibicije izražanja SR-A na mRNA in proteinskem nivoju (Liao in sod., 1999). Izražanje IL-6 v rakavih celicah je zvišano z naraščajočim potencialom malignosti in pozitivno povezano z metastaziranjem (Nakashima, 2000). Odkrili so, da razraščanje tumorja ter metastaziranje vpliva tudi na zvišanje nivoja TGF- β 1 v prostatnih tumorskih celicah (Eastham in sod., 1995). Zato je razumljivo, da TGF- β 1 in IL-6 lahko utišata izražanje SR-A1 v APC tumorskega tkiva prostate (Yang in sod., 2004). Drugače je v primeru IL-12, pri katerem so v monocitih zaznali manjše izločanje, potem ko so SR-A1 stimulirali z LPS (Sutterwala in sod., 1997).

Zaščitno funkcijo SR-A1 so našli še v nekaterih primerih. Velikokrat so pri raku našli alelno delecijo 8p21-25, na tem mestu pa se nahaja gen za SR-A1. Torej, če je ta dogodek pripomogel k nastanku raka, lahko domnevamo, da ima SR-A1 vlogo, ki to preprečuje (Xu in sod., 2002).

Tudi ko so preučevali vpliv LPS-a na SR-A1, so potrdili, da SR-A1 ne prispeva k razvoju tumorja. LPS je preko p38 zvišal izražanje gena za SR-A1, to pa je vplivalo na znižano izločanje TNF- α in znižalo aktivacijo NF- κ B. SR-A1 je zmanjšal imunski odziv, ker je znižal izločanje TNF- α , prav zanj pa je značilno, da omogoča širjenje tumorja preko zvišanega izražanja matriksnih metaloproteinaz (Xiang in sod., 2009). V tem primeru

TNF- α ni bil potreben za dvig SR-A1, v nekem drugem-protumorskem primeru pa je bil nujen za zvišanje SR-A1. Na ovarijskih rakavih celic so preučevali regulacijo SR-A1 na TAM. Kokultura mišjih makrofagov brez TNF- α ali njenih receptorjev je pokazala, da je TNF- α preko receptorja p75 nujen za sprožitev izražanja SR-A1 (Hagemann in sod., 2006). TNF- α je torej enkrat bil potreben za dvig SR-A1, drugič ne. Zanimivo je tudi, da je višje izražanje gena za SR-A1 enkrat vplivalo na znižano izločanje TNF- α , to so dokazali Xiang in sodelavci, v sledečem primeru, kjer so potrdili tako zaščitno kot protumorsko vlogo SR-A1 pri raku, pa so ugotovili nasprotno, da zvišano izražanje gena za SR-A1 pomeni zvišano izločanje TNF- α . Ligandi so preko SR-A1 zvišali sintezo TNF- α , ne pa tudi IL-12, izboljšali prezentacijo HLAII, in zvišali izražanje CD83. Vse to je vodilo v boljše zorenje dendritičnih celic in boljšo sintezo IFN- γ v celicah T. Ko so inhibirali MAPK p38, so s tem utišali nastajanje TNF- α in zorenje dendritičnih celic. Prav ta podatek, da je višje izražanje gena za SR-A1 vodilo v boljše izražanje TNF- α , kaže v tem primeru na protumorsko vlogo SR-A1 (Jin in sod., 2009).

V nekaterih raziskavah pa med SR-A1 in rakom niso našli nobene povezave. V eni so preučevali povezavo med mutacijo 999C>T in tveganjem za nastanek raka prostate. Menili so, da ta mutacija povzroči izgubo mnogih pomembnih domen SR-A1, kar vpliva na slabšo vezavo ligandov in zato obstaja večja verjetnost nastanka raka prostate. Po opravljenih poskusih so to domnevo ovrgli, saj niso dobili nobene povezave med mutacijo in večjim tveganjem za raka prostate (Hope in sod., 2005).

Druga študija, katere končni rezultat je nepojasnjena vloga SR-A1 pri raku, je preučevala mutacije v genu za SR-A1 pri pljučnem raku. Dokazali so, da le te niso pogoste ter da tudi če se pojavijo, ne povečajo občutljivosti za nastanek raka pljuč (Yoshimura in sod., 2004).

Podoben primer je bil, ko so preučevali povezavo med genetskim polimorfizmom gena za SR-A1 in tveganjem za nastanek raka prostate. Postavili so hipotezo, da so sekvenčne variacije SR-A1 povezane s tveganjem za raka prostate. Genotipizirali so tri glavne SNP-je, ki so značilni za to bolezen, vendar so po opravljeni študiji potrdili, da nobeden od teh SR-A1 SNP-jev ni povezan s povečanim tveganjem za raka prostate (Chen in sod., 2008).

Tudi mnoge naše rezultate bi lahko uvrstili v to skupino, kjer SR-A1 ni imel nobenega pomena oz. ne vemo še natančno, kakšen je pomen SR-A1 v primeru raka pljuč. Izmerili smo, da izražanje gena za SR-A1 v tumorskem tkivu ni povezano s 4-letnim preživetjem bolnikov po operaciji. Pričakovali smo, da bodo bolniki z višjim izražanjem gena za SR-A1 v tumorju prej umrli. To lahko podkrepimo z razmišljanjem, da bi verjetno umrli bolniki z bolj napredovano obliko raka, ki za svojo rast potrebuje veliko hranilnih snovi; z višjim izražanjem gena za SR-A1 v tumorskem tkivu bi si jih lahko pridobival iz maščob.

Ker smo imeli relativno večje število bolnikov s ploščatoceličnim in žleznim histološkim tipom raka pljuč, smo ti dve vrsti obravnavali posebej. Primerjali smo izražanje gena za SR-A1 v obeh tipih in ugotovili, da med njima ni nobene razlike. Pričakovali smo, da bo višje izražanje gena za SR-A1 pri žleznem tipu tumorja, saj je ta med vsemi nedrobnoceličnimi vrstami raka najbolj agresiven. Je najpogostejši (30-35 %), 5-letno preživetje je samo 12 %, operabilnost pa 35 %, njegova verjetnost metastaziranja je zmerna, odziv na sistematsko zdravljenje pa nizek (The Immune Recovery Clinic of the

Immune Recovery Foundation, 2009).

Med primere, kjer SR-A1 nima pomena ali ima zaščitno funkcijo, lahko uvrstimo tudi sledeči rezultat. Izražanje gena za SR-A1 v tumorskem tkivu je koreliralo z izražanjem gena za SR-A1 v kontrolnem tkivu, kar pomeni, da če se je izražanje zvišalo v tumorju, se je tudi v netumorskem tkivu. Predvidevali smo, da bo višje izražanje samo v tumorskem tkivu, v kontrolnem pa znižano, kajti z višjim izražanjem gena za SR-A1 samo v tumorskem tkivu in posledično znižanjem v obtumorskem tkivu, bi si tumor povečal pritek hranilnih snovi in to bi mu omogočilo rast.

V tkivih istih bolnikov so bile v preteklosti že izmerjena izražanja nekaterih genov. Naše rezultate smo primerjali z meritvami LPL-a, kajti oba, SR-A1 in LPL pomagata pri eksogeni preskrbi rakavega tkiva z maščobami. Ob preučevanju LPL-a so v tumorskem tkivu izmerili zvišano aktivnost encima, izražanje pa je bila znižano (Trošt in sod., 2009). Zvišano aktivnost razlagajo kot mehanizem možnega dodatnega pritoka prostih maščobnih kislin, lipidov in lipoidnih substanc v tumor, saj je uravnavanje tkivno specifične aktivnosti LPL-a dokazan fiziološki mehanizem za izboljšanje preskrbe tkiva z lipidi. S tem so lipidi pravilno prerazporejeni med tkivi oz. jih je več v tkivih z večjimi potrebami (Černe in sod., 2007). V netumorskem tkivu je bilo obratno, aktivnost je bila znižana, izražanje pa zvišano. Ugotovitve so razložili s tem, da je znižana aktivnost LPL-a v netumorskem tkivu vodila v nizek hranilni in energijski status omenjenega tkiva, posledično pa se je povečalo gensko izražanje LPL-a, da se je pomanjkanje odpravilo (Trošt in sod., 2009). Naše meritev so pokazale, da v tumorskem tkivu izražanje gena za SR-A1 korelira z izražanjem gena za LPL, kar kaže na protumorsko vlogo SR-A1. Predvidevamo, da gre za isti tip celice, na kateri je SR-A1, sintetizira pa tudi LPL. Mnoge pretekle raziskave dokazujejo, da se SR-A1 izraža na makrofagih, (Hagemann in sod., 2006, Komohoara in sod., 2009; Kawamura in sod., 2009) sinteza LPL-a pa prav tako poteka v veliki meri tudi v makrofagih. Kot je že zgoraj omenjeno, je SR-A1 značilen za TAM ter VLC, ki so jih našli pri različnih vrstah rakov. Za TAM je značilno, da izražajo M2 fenotip (Gordon, 2003), prav ta pa je značilen za tumor. Torej, če so prisotne tumorske celice, te povzročijo fenotipski premik M1 polariziranih makrofagov k M2 fenotipu in ta vrsta makrofagov začne izražati SR-A1. Ker izražanje gena za LPL korelira z izražanjem gena za SR-A1, je možno, da te celice (TAM in VLC), ki imajo protumorsko vlogo, sintetizirajo tudi LPL. Če je to res, to pojasnjuje tudi dejstvo, da aktivnost LPL-a korelira s preživetjem. Nižja aktivnost LPL-a v tumorskem tkivu omogoča daljše preživetje bolnika po operaciji kot višja aktivnost. To smo pričakovali tudi v primeru SR-A1, pri pacientih z višjim izražanjem gena za SR-A1 v tumorskem tkivu, smo pričakovali krajše preživetje; rezultati pa so pokazali, da ni razlike v izražanju gena za SR-A1 med preživelimi in umrlimi pacienti 4 leta po operaciji.

Prav korelacija med izražanjem genov za SR-A1 in LPL v tumorskem tkivu nam odpira nove možnosti raziskovanja. Čeprav so podatki različni, lahko vseeno trdimo, da ima SR-A1 vlogo v onkogenezi tudi z modulacijo imunskega sistema, in vsekakor je vredno nadaljnjega preučevanja, da bi ugotovili, če je ta modulacija povezana z regulacijo preskrbe hranil z LPL-om.

5.2 SKLEPI

- Izražanje gena za SR-A1 je bilo v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu nižje kot v obtumorskem tkivu, kar je v nasprotju s postavljeno hipotezo; ugotovitev kaže na zaščitno vlogo SR-A1;
- izražanje gena za SR-A1 v rakavem tkivu je koreliralo z izražanjem gena za LPL, ki je znan pospeševalec napredovanja rakave bolezni; rezultat predstavlja tumorsko vlogo SR-A1;
- izražanje gena za SR-A1 v rakavem in sosednjem nerakavem tkivu ni bilo povezano z nobenim drugim kliničnim in anamnestičnim podatkom bolnikov (stadij bolezni, število let kajenja, starost, spol, teža bolnikov, histološki tip tumorja, 4-letno preživetje po operaciji).

6 POVZETEK

Pljučni rak je primaren in sekundaren tumor bronhijev ali pljučnega parenhima. Je najpogostejša oblika raka na svetu in najpogostejši vzrok smrti, povezane z rakom. Je vsaj dvakrat pogostejši od drugih pogostih oblik raka: raka dojke, kolorektalnega raka ali raka prostate.

Poglavitni vzrok za nastanek pljučnega raka je oksidativni stres in z njim povezan proces karcinogeneze. Do oksidativnega stresa pride zaradi neravnotežja med koncentracijo reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti in antioksidativnim obrambnim mehanizmom telesa. Reaktivne kisikove zvrsti povzročajo *in vivo* oksidacijo lipidov, proteinov in DNA. Prosti radikali in lipidni peroksidi, ki pri tem nastanejo, pa pomembno sodelujejo pri karcinogenezi. V procesu karcinogeneze pride do kopičenja genetskih sprememb, ki vodijo v nastanek raka.

Dejavniki tveganja za nastanek pljučnega raka so kajenje, onesnažen zrak, azbestni prah, izpostavljenost arzeniu, radioaktivnemu sevanju, radonu, policikličnim ogljikovodikom, vinilkloridu, kromu, niklju, beriliju,...

Pljučni rak v grobem delimo na drobnoceličnega (15-25 %) in na nedrobnocelične raka (75-85 %) ter redke ostale oblike (2-3 %). Nedrobnocelični raki so: ploščatocelični rak, žlezni rak in velikocelični rak. Zamejitev raka določamo s TNM sistemom, kjer T določa velikost tumorja, N prizadetost bezgavk, M pa prisotnost oddaljenih metastaz.

Znano je, da rakavo tkivo s pomočjo endogenih in eksogenih mehanizmov pridobiva lipide, ki mu služijo kot energetski vir, celični gradniki ter kot prekursorji pomembnih regulatornih spojin. Pri eksogenem mehanizmu sodelujejo SR (razred A (tip 1, 2, 3), B in C), LPL, APOE in receptor za LDL, pri endogenem mehanizmu pa FAS.

V raziskovalnem delu smo preučili manjši segment širšega preučevanja mehanizmov preskrbe rakavega tkiva z lipidi, kot so višje maščobne kisline, holesterol, fosfolipidi in ostale v maščobah topne spojine ter se osredotočili na SR-A1 in njegov pomen v smislu oskrbovanja pljučnega raka z lipidi. Po pregledu literature smo ugotovili, da ima SR-A1 pri različnih vrstah raka različne vloge, lahko pomaga tumorju pri rasti, lahko deluje kot zaščita pred tumorjem, ali pa je njegova vloga nepojasnjena. Največkrat pa smo SR-A1 zasledili v primerih, kjer je deloval v korist tumorskega tkiva.

Postavili smo hipotezo, da je v tumorju izražanje gena za SR-A1 višje kot v obtumorskem tkivu, kar bi pomembno prispevalo k receptorsko posredovani endocitozi oxLDL-a, s tem pa k boljši preskrbi tumorja z lipidi, nujnimi za rast in razvoj. Druga hipoteza je bila, da višje izražanje posledično korelira vsaj s katerim od opazovanih kliničnih podatkov bolnikov, kot so stadij bolezni, število let kajenja, starost, spol, teža bolnikov, histološki tip tumorja, 4-letno preživetje po operaciji, izražanje gena za LPL in njegova aktivnost.

Da bi naši hipotezi dokazali, so kirurgi 42 bolnikom z nedrobnoceličnim pljučnim rakom v stadiju I, II in III odvzeli vzorce tumorskega tkiva in normalnega tkiva na periferiji pljuč. Iz vzorcev smo izolirali RNA, izvedli reverzno transkripcijo ter s PCR-jem v realnem času

izmerili izražanje gena za SR-A1 v vseh vzorcih. Po opravljeni statistični analizi smo dobili sledeče rezultate: izražanje gena za SR-A1 je bilo v kontrolnem tkivu 2,2 krat višje kot v tumorskem tkivu, obenem pa je izražanje v tumorskem tkivu koreliralo z izražanjem v kontrolnem tkivu; izražanje gena za SR-A1 v tumorskem tkivu ni koreliralo s stadijem bolezni, je pa koreliralo z izražanjem gena za LPL; ni bilo razlike v izražanju gena za SR-A1 med ploščatoceličnim in žleznim histološkim tipom tumorja, niti ne med preživelimi ali umrlimi bolniki 4 leta po operaciji. Predvidevamo, da bi rezultati mogoče bili drugačni, če bi preučevali večje število bolnikov ter da bi v raziskavo vključili tudi IV. stadij bolezni.

Ker smo v literaturi zasledili različne vloge SR-A1, smo tudi sami poskušali ugotoviti pomen SR-A1 pri raku pljuč. Zaščitno vlogo SR-A1 dokazuje rezultat, v katerem je bilo izražanje gena za SR-A1 v kontrolnem tkivu višje kot v tumorskem tkivu, kajti nižje izražanje gena za SR-A1 ne omogoča tumorju privzem dodatnih hranilnih snovi za razvoj.

V tumorskem tkivu je izražanje gena za SR-A1 koreliralo z izražanjem gena za LPL, iz česar lahko sklepamo, da v tem primeru SR-A1 deluje v korist tumorju. Aktivnost in izražanje gena za LPL v tkivih namreč zagotavljata kontrolo nad privzemom prostih maščobnih kislin, lipidov in lipoproteinov v tkiva, kjer so hranila najbolj potrebna. Glede na dobljeni rezultat predvidevamo, da gre tako v primeru LPL kot tudi SR-A1 za en tip celice. Mnoge pretekle raziskave dokazujejo, da se SR-A1 izraža na makrofagih, sinteza LPL-a pa prav tako poteka v veliki meri tudi v makrofagih.

Izražanje gena *msr1* v rakavem in zdravem tkivu ni bilo povezano z nobenim drugim kliničnim in anamnestičnim podatkom bolnikov.

7 VIRI

- Baebler Š. 2006. Izražanje genov pri občutljivi in odporni sorti krompirja (*Solanum tuberosum* L.) v zgodnjem odzivu na okužbo s krompirjevim virusom Y^{NTN}. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 108 str.
- Bak P. S., Walters J. J., Takeya M., Conejo-Garcia J. R., Brewin B. L. 2007. Scavenger receptor-A-targeted depletion inhibits peritoneal ovarian tumor progression. *Cancer Research*, 67, 10: 4783-4789
- Berwin B., Hart J. P., Rice S., Gass C., Pizzo S. V., Post S. R., Nicchitta C. V. 2003. Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *The EMBO Journal*, 22: 6127-6136
- Chen Y. C., Giovannucci E., Kraft P., Hunter DJ. 2008. Association between genetic polymorphisms of macrophage scavenger receptor 1 gene and risk of prostate cancer in the health professionals follow-up study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers&Prevention*. 2008; 17; 4: 1001-1003
- Chen Y. C., Pohl G., Wang T. L., Morin P. J., Risberg B., Kristensen G. B. Yu A., Davidson B., Shih IeM. 2005. Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer. *Cancer Research*, 65: 331-337
- Černe D. 2008. Lipidi. Izvlečki predavanj za predmet Klinična kemija na univerzitetnem programu Farmacija. Ljubljana, 7 str.
- Černe D., Melkič E., Trošt Z., Sok M., Marc J. 2007. Lipoprotein lipase activity and gene expression in lung cancer and in adjacent noncancer lung tissue. *Experimental Lung Research*, 33; 217-225
- Debeljak A., Triller N., Kecelj P., Pompe-Kirn V., Rott T., Osolnik K., Cesar R., Požek I., Marčun R., Juvan-Žavbi M., Movrin-Stanovnik T., Kandare F., Fležar M., Koren I., Letonja S., Kern I., Vidmar S., Kovač V., Lahajnar S., Šiferer F., Turel M. 2001. Smernice za internistično obravnavo bolnika s pljučnim rakom, Uradno stališče Združenja pulmologov Slovenije. *Zdravniški vestnik*, 70, 12: 721-794
- Delimaris I., Faviou E., Antonakos G., Stathopoulou E., Zachari A., Dionyssiou-Asteriou A. 2007. Oxidized LDL, serum oxidizability and serum lipid levels in patients with breast or ovarian cancer. *Clinical Biochemistry*, 40: 1129-1134
- Eastham J. A., Truong L. D., Rogers E., Kattan M., Flanders K. C., Scardino P. T., Thompson T. C. 1995. Transforming growth factor- β 1: comparative immunohistochemical localization in human primary and metastatic prostate cancer. *Laboratory Investigation*, 3: 628-635
- Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*; 3: 23-25

- Hagemann T., Wilson J., Burke F., Kulbe H., Li N. F., Plüddemann A., Charles K., Gordon S., Balkwill F. R. 2006. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *The Journal of Immunology*, 176: 5023-5032
- Hope Q., Bullock S., Evans C., Meitz J., Hamel N., Edwards S. M., Severi G., Dearnaley D., Jhavar S., Southgate C., Falconer A., Dowe A., Muir K., Houlston R. S., Engert J. C., Roquis D., Sinnott D., Simard J., Heimdal K., Moller P., Maehle L., Badzioch M., Eeles E. A., Easton D. F., English D. R., Southey M. c., Hopper J. L., Foulkes W. D., Giles G. G. 2005. Macrophage scavenger receptor 1 999C>T mutation and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers&Prevention*, 14, 2: 397-402
- Hughes-Fulford M., Chen Y., Tjandrawinata R. R. 2001. Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis*, 22, 5: 701-707
- Jin J. O., Park H. Y., Xu Q., Park J. I., Zvyagintseva T., Stonik V. A., Kwak J. Y. 2009. Ligand of scavenger receptor class A indirectly induces maturation of human blood dendritic cells via production of tumor necrosis factor-alpha. *Blood*, 113, 23: 5839-5847
- Kawamura K., Kornohara Y., Takaishi K., Katabuchi H., Takeya M. 2009. Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathology International*, 59: 300-305
- Komohara Y., Takemura K., Lei XF., Sakashita N., Harada M., Suzuki H., Kodama T., Takeya M. 2009. Delayed growth of EL4 lymphoma in SR-A-deficient mice is due to upregulation of nitric oxide and interferon-gamma production by tumor-associated macrophages. *Cancer Science*, 100, 11: 2160-2166
- Košnik M. 2005. Bolezni dihal. V: *Interna medicina*, tretja izdaja. Kocijančič A., Mrevlje F., Štajer D (ur.). Ljubljana, *Littera picta*: 348-354
- Kuhajda F. P. 2006. Fatty acid Synthase and Cancer: New application of an old pathway. *Cancer Research*, 66: 5977-5980
- Kuhajda F. P., Jenner K., Wood F. D., Hennigar R. A., Jacobs L. B., Dick J. D., Pasternack G. R. 1994. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proceedings of the national Academy of Sciences U S A*, 91: 6379-6383
- Kunjathoor V. V, Febbraio M., Podrez E.A. Moore K. J., Andersson L., Koehn S., Rhee J. S., Silverstein R., Hoff H. F., Freeman M. W. Scavenger receptor class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. 2002. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 49982-49988
- Liao H. S, Matsumoto A., Itakura H., Doi T., Honda M., Kodama T., Geng Y. J. 1999. Transcriptional inhibition by interleukin-6 of the class A macrophage scavenger

receptor in macrophages derived from human peripheral monocytes and the THP-1 monocytic cell line. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19: 1872-1880

Luzar B., Poljak M., Glavač D., Balažič J. (ur.). 2005. Molekularna diagnostika v medicini. V: Zbornik predavanj in posterjev. 15. spominsko srečanje akademika Janeza Milčinskega, Letno srečanje Sekcije za klinično mikrobiologijo in hospitalne infekcije SZD in XXXVI. memorialni sestanek profesorja Janeza Plečnika, Ljubljana, 30. 11.-2. 12. 2005. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 167-176

MedicineNet. Lung cancer (24. 9. 2009)

http://www.medicinenet.com/lung_cancer/page2.htm (3.12.2009)

Merkel M., Eckel R. H., Goldberg I. J. 2002. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake and regulation. *Journal of Lipid Research*, 43, 12: 1997-2006

Nakashima J., Tachibana M., Horiguchi Y., Oya M., Ohigashi T., Asakura H., Murai M. 2000. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 6: 2702-2706

Nishimura N., Harada-Shiba M., Tajima S., Sugano R., Yamanura T., Qiang Q. Z., Yamamoto A. 1998. Acquisition of secretion of transforming growth factor- β 1 leads to autonomous suppression of scavenger receptor activity in a monocyte-macrophage cell line, THP-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 1562-1567

Osborne T. F. 2000. Sterol Regulatory Element Binding Proteins (SREBPs): Key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 32379-32382

Pizer E. S., Thupari J., Han W. F., Pinn M. L., Chrest F. J., Frehywot G. L., Townsend C.A., Kuhajda F. P. 2000. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Research*, 60: 213-218

Plüddemann A., Neyen C., Gordon S. 2007. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods*, 43: 207-217

Preiss-Landl K., Zimmermann R., Hämmerle G., Zechner R. 2002. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 13: 471-481

Slanc P. 2007. Genska informacija in kako do nje. V: Biološka zdravila. Štrukelj B. in Kos J. (ur). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 56-57

Sobin L. H., Wittekind C. 2002. TNM Classification of Malignant Tumours. 6. izdaja. New York, Wiley: 309 str.

- Sutterwala F. S, Noel G. J, Clynes R., Mosser D. M. 1997. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *The Journal of Experimental Medicine*, 185: 1977-1985
- Suzuki K., Ito Y., Wakai K., Kawado M., Hashimoto S., Toyoshima H., Kojima M., Tokudome S., Hayakawa N., Watanabe Y., Tamakoshi K., Suzuki S., Ozasa K., Tamakoshi A. 2004. Serum oxidized low-density lipoprotein levels and risk of colorectal cancer: a case-control study nested in the Japan collaborative cohort study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers&Prevention*, 13, 11: 1781-1787
- Terčelj M. 2006. Zgodnje odkrivanje raka. *Radiol Oncol*, 40, 1: S59-S66
- The Immune Recovery Clinic of the Immune Recovery Foundation. Lung cancer (21. 10. 2009)
<http://www.immunerecovery.net /Lung%20Cancer.htm> (3. 12. 2009)
- Travis W. D, Brambilla E., Muller-Hermelink H. K., Harris C. C. 2004. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, IARC Press: 344 str.
- Triller N. Ozaveščanje o raku pljuč. 2009. ABC zdravja.
<http://www.abczdravja.si/> (12. 1. 2010)
- Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3, 2: 133-146
- Trošt Z., Sok M., Marc J., Černe D. 2008. Increased apolipoprotein E gene expression and protein concentration in lung cancer tissue do not contribute to the clinical assessment of non-small cell lung cancer patients. *Archives of Medical Research*, 39: 663-667
- Trošt Z., Sok M., Marc J., Černe D. 2009. Increased lipoprotein lipase activity in non-small cell lung cancer tissue predicts shorter patient survival. *Archives of Medical Research*, 40: 364-368
- Valasek M. A., Repa J. J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*. 29: 151-159
- Wang X-Y., Facciponte J., Chen X., Subjeck J. R., Repasky E. A. 2007. Scavenger receptor-A negatively regulates antitumor immunity. *Cancer Research*, 67, 10: 4996-5002
- Xiang Q., Wen L., Liu MH., Zhang Y., Qu JF., Tian J. Endotoxin tolerance of RAW264.7 correlates with p38-dependent up-regulation of scavenger receptor-A. 2009. *Journal of International Medical Research*, 37, 2: 491-502
- Xu J., Zheng S. L, Komiya A., Mychaleckyj J. C., Isaacs S. D., Hu J. J., Sterling D., Lange E. M., Hawkins G. A., Turner A., Ewing C. M., Faith D. A., Johnson J. R., Suzuki H.,

- Bujnovszky P., Wiley K. E., DeMarzo A. M., Bova G.S., Chang B., Hall M. C., McCullough D. L., Partin A. W., Kassabian V. S., Carpten J. D., Bailey-Wilson J. E., Trent J. M., Ohar J., Bleecker E. R., Walsh P. C., Isaacs W. B., Meyers D. A. 2002. Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nature Genetics*, 32: 321-325
- Yang G., Addai J., Tian W., Frolov A., Wheeler T. M., Thompson T. C. 2004. Reduced infiltration of class A scavenger receptor positive antigen-presenting cells is associated with prostate cancer progression. *Cancer Research*, 64: 2076-2082
- Yang Y. A., Han W. F., Morin P. J., Chrest F. J., Pizer E. S. 2002. Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Experimental Cell Research*, 279: 80-90
- Yi H., Yu X., Gao P., Wang Y., Baek S.-H., Chen X., Kim H. L., Subkeck J. R., Wang X. Y. 2009. Pattern recognition scavenger receptor SRA/CD204 down-regulates TLR4 signaling dependent CD8 T-cell activation. *Blood*, 113, 23: 5819-5828
- Yoshimura A., Gemma A., Kataoka K., Hosoya Y., Noro R., Seike M., Kokubo Y., Watanabe M., Kudoh S. 2004. Mutational analysis of the macrophage scavenger receptor 1 (MSR1) gene in primary lung cancer. *Journal of Nippon Medical School*, 71, 2: 99-104
- Young C. D. in Anderson S. M. 2008. Sugar and fat-that's where it's at: metabolic changes in tumors. *Breast Cancer Research*, 10, 1: 1-9

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, izr. prof. dr. Darku Černetu, za vzpodbudo, kritike in pohvale ter potrpežljivost pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala tudi Irmi Štern in Nataliji Kociper za pomoč pri laboratorijskem delu ter vsem iz Laboratorija za molekularno diagnostiko na Fakulteti za farmacijo, ki so mi kakor koli pomagali pri delu.

Za recenzijo diplomske naloge se zahvaljujem izr. prof. dr. Marku Kreftu.

Zahvala gre tudi mojim domačim, ki so me skozi celoten študij podpirali in mi stali ob strani.