

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maja OTA

**VPLIV GENETSKIH POLIMORFIZMOV ENCIMOV, KI  
ODSTRANJUJEJO REAKTIVNE KISI KOVE SPOJINE, NA  
OBOLEVNOST ZA PLJUČNIM RAKOM PRI SLOVENSКИH  
BOLNIKI H**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**GENETIC POLYMORPHISM OF ENZYMES THAT SCAVENGE  
REACTIVE OXYGEN SPECIES AND LUNG CANCER  
SUSCEPTIBILITY IN SLOVENE PATIENTS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Vito Dolžan.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	Prof. dr. Damjana DROBNE Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Mentor:	Prof. dr. Vita DOLŽAN Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo
Recenzent:	Prof. dr. Gregor ANDERLUH Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga 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.

Maja OTA

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	577.2:616-006:616-074(497.4)(043.2)=863
KG	mangan superoksid dismutaza/katalaza/genetski polimorfizem/pljučni rak
AV	OTA, Maja
SA	DOLŽAN, Vita
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2007
IN	VPLIV GENETSKIH POLIMORFIZMOV ENCIMOV, KI ODSTRANJUJEJO REAKTIVNE KISI KOVE SPOJINE, NA OBOLEVNOST ZA PLJUČNIM RAKOM PRI SLOVENSKIH BOLNIKI H
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 62 str., 14 pregl., 4 sl., 38 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Polimorfizmi v genih za antioksidantne encime, ki se kažejo v spremenjeni sposobnosti odstranjevanja ROS, lahko vplivajo na tveganje za nastanek pljučnega raka. V diplomski nalogi smo raziskali vpliv polimorfizma C1183T v genu za MnSOD in polimorfizma C-262T v genu za katalazo na tveganje za nastanek pljučnega raka pri slovenskih bolnikih. Prisotnost obeh polimorfizmov smo določali z metodo genotipizacije. V preiskavo smo vključili 133 bolnikov s pljučnim rakom in 153 nesorodnih odraslih zdravih oseb. Ugotovili smo, da se porazdelitev genotipov za polimorfizem C1183T MnSOD pri bolnikih s pljučnim rakom in pri zdravih kontrolah ni statistično značilno razlikovala ( $\chi^2=1.271$ , $m=2$ , $p=0.530$ ), ter da polimorfizem C1183T MnSOD ni vplival na tveganje za nastanek pljučnega raka (OR=0.734, 95% CI=0.428-1.259). Tudi porazdelitev genotipov za polimorfizem C-262T katalaze se pri bolnikih s pljučnim rakom in pri zdravih kontrolah ni statistično značilno razlikovala ( $\chi^2=1.682$ , $m=2$ , $p=0.431$ ). Polimorfizem C-262T ni vplival na tveganje za nastanek pljučnega raka (OR=1.115, 95% CI=0.682-1.823).

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

SD Dn  
DC 577.2:616-006:616-074(497.4)(043.2)=863  
CX manganese superoxide dismutase/catalase/genetic polymorphism/lung cancer  
AU OTA, Maja  
AA DOLŽAN, Vita  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2007  
TI GENETIC POLYMORPHISM OF ENZYMES THAT SCAVENGE REACTIVE OXYGEN SPECIES AND LUNG CANCER SUSCEPTIBILITY IN SLOVENE PATIENTS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 62 p., 14 tab., 4 fig., 38 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Polymorphisms in genes coding for antioxidant enzymes, which alter the efficiency for ROS scavenging, can influence lung cancer risk. In our study, we evaluated the influence of C1183T MnSOD polymorphism and C-262T polymorphism in the catalase gene on lung cancer susceptibility in Slovene patients. Genotyping method was used to analyze both polymorphisms. The study population consisted of 133 lung cancer patients and 153 healthy controls. There were no statistically significant differences in genotype distribution between patients and controls for C1183T MnSOD polymorphism ( $\chi^2=1.271$ ,  $m=2$ ,  $p=0.530$ ) and for C-262T catalase polymorphism ( $\chi^2=1.682$ ,  $m=2$ ,  $p=0.431$ ). Neither C1183T MnSOD polymorphism (OR=0.734, 95% CI=0.428-1.259) nor C-262T catalase polymorphism (OR=1.115, 95% CI=0.682-1.823) were associated with lung cancer risk.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	X
1. Uvod .....	1
2. Namen dela.....	5
3. Delovna hipoteza .....	6
4. Pregled objav .....	7
4.1. Reaktivne kisikove spojine.....	7
4.1.1. Superoksidni anion .....	7
4.1.2. Vodikov peroksid .....	8
4.1.3. Hidroksilni radikal.....	8
4.1.4. Singletni kisik.....	9
4.2. Reaktivne kisikove spojine v bioloških sistemih.....	9
4.2.1. Oksidativni stres .....	10
4.2.2. Oksidativni stres in rak.....	11
4.2.3. Markerji oksidativnega stresa.....	11
4.2.4. Reaktivne kisikove spojine v pljučih.....	11
4.3. Obrambni mehanizmi pljuč pred reaktivnimi kisikovimi spojinami.....	12
4.3.1. Antioksidantni encimi .....	12
4.3.1.1. Superoksid dismutaze .....	12
4.3.1.2. Katalaza .....	14
4.3.1.3. Glutationski sistem .....	15
4.3.2. Antioksidanti .....	16
4.4. Polimorfizmi v genih za SOD .....	17
4.4.1. Polimorfizmi v genu za CuZnSOD .....	17
4.4.2. Polimorfizmi v genu za ECSOD .....	17
4.4.3. Polimorfizma v genu za MnSOD .....	17

4.4.3.1. Pogostost polimorfizma C1183T v genu za MnSOD.....	18
4.5. Polimorfizem v genu za katalazo.....	19
4.5.1. Pogostost polimorfizma C-262T v genu za katalazo.....	19
4.6. Pljučni rak.....	20
4.6.1. Epidemiološke značilnosti.....	20
4.6.2. Razvoj pljučnega raka.....	20
4.6.3. Škodljivi dejavniki.....	21
4.6.4. Patološka klasifikacija pljučnih tumorjev.....	21
4.7. Polimorfizmi v genih za antioksidantne encime in rak.....	22
5. Material in metode.....	23
5.1. Preiskovanci.....	23
5.2. Izolacija DNA.....	24
5.3. Analiza polimorfizma C1183T v genu za MnSOD.....	24
5.3.1. Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	24
5.3.1.1. Material.....	25
5.3.1.2. Metode.....	25
5.3.2. Analiza produktov PCR z elektroforezo na agaroznem gelu.....	26
5.3.2.1. Material.....	26
5.3.2.2. Metode.....	27
5.3.3. Analiza polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov.....	27
5.3.3.1. Material.....	27
5.3.3.2. Metode.....	28
5.3.4. Ugotavljanje dolžin produktov cepljenja z elektroforezo na agaroznem gelu.....	28
5.3.4.1. Material.....	28
5.3.4.2. Metode.....	28
5.4. Analiza polimorfizma C-262T v genu za katalazo.....	29
5.4.1. Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	29
5.4.1.1. Material.....	29
5.4.1.2. Metode.....	30
5.4.2. Analiza produktov PCR z elektroforezo na agaroznem gelu.....	31
5.4.2.1. Material.....	31
5.4.2.2. Metode.....	31

5.4.3. Analiza polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov.....	31
5.4.3.1. Material.....	31
5.4.3.2. Metode.....	31
5.4.4. Ugotavljanje dolžin produktov cepljenja z elektroforezo na agaroznem gelu .....	32
5.4.4.1. Material.....	32
5.4.4.2. Metode.....	32
5.5. Statistična analiza .....	33
5.5.1. Test $\chi$ -kvadrat .....	33
5.5.2. Relativno tveganje in razmerje obetov .....	33
6. Rezultati.....	35
6.1. Rezultati genske analize na agaroznem gelu .....	35
6.1.1. Analiza polimorfizma C1183T v genu za MnSOD .....	35
6.1.2. Analiza polimorfizma C-262T v genu za katalazo.....	37
6.2. Pogostost polimorfizma C1183T v genu za MnSOD.....	39
6.3. Pogostost polimorfizma C-262T v genu za katalazo.....	43
6.4. Pogostost kombinacije polimorfizma v genu za MnSOD in genu za katalazo .....	47
7. Razprava in sklepi .....	48
7.1. Razprava .....	48
7.1.1. Vpliv polimorfizma C1183T v genu za MnSOD .....	48
7.1.2. Vpliv polimorfizma C-262T gena za katalazo .....	50
7.1.3. Skupni vpliv polimorfizma C1183 MnSOD in C-262T katalaze .....	51
7.2. Sklepi.....	53
8. Povzetek .....	55
9. Viri.....	58

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Značilnosti bolnikov s pljučnim rakom	.....	23
Preglednica 2:	Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov MnSOD	.....	25
Preglednica 3:	Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov CAT	.....	29
Preglednica 4:	Frekvence genotipov za polimorfizem C1183T pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah	.....	39
Preglednica 5:	Frekvence alelov za polimorfizem C1183T pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah	.....	39
Preglednica 6:	Frekvence genotipov za polimorfizem C1183T pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in zdravih kontrolah	.....	40
Preglednica 7:	Frekvence združenih genotipov za polimorfizem C1183T pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah	.....	41
Preglednica 8:	Porazdelitev genotipov za polimorfizem C1183T v posameznem starostnem razredu pri bolnikih s pljučnim rakom	.....	42
Preglednica 9:	Frekvence genotipov za polimorfizem C-262T pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah	.....	43
Preglednica 10:	Frekvence alelov za polimorfizem C-262T pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah	.....	43
Preglednica 11:	Frekvence genotipov za polimorfizem C-262T pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in zdravih kontrolah	.....	44
Preglednica 12:	Frekvence združenih genotipov za polimorfizem C-262T pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah	.....	45
Preglednica 13:	Porazdelitev genotipov za katalazo v posameznem starostnem razredu pri bolnikih s pljučnim rakom	.....	46
Preglednica 14:	Porazdelitev kombinacije genotipov za MnSOD in katalazo pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah	.....	47



## KAZALO SLIK

Slika 1:	Analiza produktov verižne reakcije s polimerazo gena za MnSOD na agaroznem gelu	..... 35
Slika 2:	Analiza dolžine produktov cepljenja z restrikcijsko endonukleazo <i>NgoM IV</i> na agaroznem gelu	..... 36
Slika 3:	Analiza produktov verižne reakcije s polimerazo gena za katalazo na agaroznem gelu	..... 37
Slika 4:	Analiza dolžine produktov cepljenja z restrikcijsko endonukleazo <i>Sma I</i> na agaroznem gelu	..... 38

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenin
Ala	aminokislina alanin
Arg	aminokislina arginin
C	citozin
CI	interval zaupanja
CuZnSOD	citosolna superoksid dismutaza
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
ECSOD	ekstracelularna superoksid dismutaza
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
G	gvanin
Gly	aminokislina glicin
GSH	glutation
GSSG	oksidirana oblika glutaciona
Ile	aminokislina izolevcin
kb	kilobaza
MnSOD	mangan superoksid dismutaza
MTS	mitohondrijska tarčna sekvenca
NADPH	reducirana oblika nikotin adenin dinukleotid fosfata
OR	razmerje obetov
PCR	verižna reakcija s polimerazo
ROS	reaktivne kisikove spojine
RR	relativno tveganje
SOD	superoksid dismutaza
T	timin
TBE	Tris-borat-EDTA
Thr	aminokislina treonin
TIM	translokaza notranje membrane mitohondrija
TOM	translokaza zunanje membrane mitohondrija
Tris-HCl	tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorid

UV                    ultravijolično  
Val                    aminokislina valin

## 1. Uvod

Reaktivne kisikove spojine (ROS), ki vključujejo superoksidni anion, vodikov peroksid, visoko reaktiven hidroksilni radikal in singletni kisik (Waris in sod., 2006), nastajajo pri normalnem celičnem dihanju med redukcijo molekularnega kisika v mitohondijski elektronski transportni verigi, v reakcijah s citokrom P450 oksidazo, ksantin oksidazo, lipooksigenazo in ciklooksigenazo (Li in sod., 2005), tvorijo pa se tudi med presnovo ksenobiotikov (Egan in sod., 2003) in estradiolov ter v vnetnih celicah z NADPH oksidazo (Hirvonen in sod., 2002).

Kljub temu, da so ROS vključene v signalizacijske poti in regulacijo celične homeostaze (Kinnula in Crapo, 2003), je njihovo delovanje, kadar pride do neravnovesja med biološkimi oksidantnimi in antioksidantnimi procesi, citotoksično (Cross in sod., 2002).

Če ROS nastajajo v celicah in tkivih, ki imajo zadostno antioksidantno moč in sposobnost popravila, je škodljivih učinkov malo (Ambrosone in sod., 1999). V nasprotnem primeru prihaja zaradi njihovega presežka do poškodb celičnih komponent, saj reagirajo z lipidi v membranah, nukleotidi v DNA in sulfhidrilnimi skupinami proteinov (Waris in sod., 2006). Oksidativne poškodbe DNA lahko vplivajo na začetek in napredovanje procesa karcinogeneze (Waris in sod., 2006). Zaradi neuravnovešenosti redoks stanja se spremeni okolje v celici, kar lahko sproži nastanek mutacij in/ali inaktivacijo tumorskih supresorskih genov. Aktivirajo se lahko onkogeni, ki spremenijo rast in preživetje celic (Kinnula in sod., 2004).

Oksidativne poškodbe bioloških molekul preprečujejo in/ali zmanjšujejo antioksidantni sistemi, ki so prisotni tudi v pljučih. Sistem vključuje številne mehanizme, ki bodisi razstrupijo reaktivne produkte bodisi jih pretvorijo v produkte, ki jih lahko odstranijo drugi antioksidanti (Comhair in Erzurum, 2002). Antioksidantni obrambni sistem vključuje antioksidante, antioksidantne encime in številne poti za popravilo oksidativnih poškodb (Rahman in sod., 2006). Glavni antioksidantni encimi so superoksid dismutaze (SOD), katalaza in glutation peroksidaza (Van Remmen in sod., 2003).

SOD so prisotne v vseh celicah. Vloga SOD je zaščita pljuč pred prostimi radikali, ki nastajajo pri normalnem celičnem metabolizmu, poleg tega pa preprečujejo napredovanje bolezni, ki so povezane z oksidanti. Vse SOD dismutirajo superoksidni anion v vodikov peroksid, ločijo pa se glede na strukturo, lokacijo, inducibilnost in zahtevo po kovinskem ionu (Rahman in sod., 2006). Mitohondrijska SOD (MnSOD) predstavlja 10-15% celotne SOD (Rahman in sod., 2006). MnSOD je homotetramerni protein z molekulsko maso 88 kDa, ki ima v aktivnem centru Mn. Gen se nahaja na kromosomu 6 (območje 6q25). Promotorska regija je brez elementov zaporedja TATA ali CAAT, vsebuje pa mesta, ki so bogata z GC. Njeno izražanje je visoko v respiratornem epitelu, alveolarnih epitelnih celicah tipa II, alveolarnih makrofagih, fibroblastih intersticija in visceralni plevri (Kinnula in Crapo, 2003).

V razgradnjo vodikovega peroksida v pljučih so udeleženi številni encimi, med katerimi sta najbolj pomembni katalaza in glutation peroksidaza (Kinnula in Crapo, 2003). Sesalska katalaza je kompleks štirih identičnih podenot z molekulsko maso 60 kDa (skupna molekulska masa je 240 kDa). Vsaka podenota vsebuje skupino hema (Fe(III) - protoporfirin IX). 34 kb (kilobaz) dolg gen za katalazo je sestavljen iz 13 eksonov in se nahaja na kromosomu 11 (območje 11p13). Proksimalni promotor je brez zaporedja TATA, vsebuje pa številna CCAAT in GGGCGG zaporedja. Regija je bogata z GC (Quan in sod., 1986). Katalaza metabolizira majhne molekule, kot so vodikov peroksid ter metil in etil hidroperoksid, ne katalizira pa razgradnje visoko molekularnih peroksidov, npr. produktov lipidne peroksidacije (Comhair in Erzurum, 2002). Nahaja se predvsem v peroksisomih, a jo najdemo tudi v citoplazmi alveolarnih makrofagov. Izraža se v alveolarnih pnevmocitih tipa II, ki so najbolj odporne celice proti oksidantom in hiperoksiji, v endotelnih celicah, epitelnih celicah bronhijev in celicah gladkih mišic ter v ekstracelularni tekočini spodnjega respiratornega trakta (Kahlos in sod., 2001). Katalaza je najbolj učinkovita pri visokih koncentracijah vodikovega peroksida, pri nižjih koncentracijah vodikovega peroksida in drugih peroksidov pa ima pomembno vlogo glutationski sistem (Comhair in Erzurum, 2002).

V genu za MnSOD sta bila opisana dva polimorfizma. Polimorfizem Ile58Thr vključuje zamenjavo C v T na nukleotidnem mestu 339, polimorfizem Ala-9Val pa zamenjavo C v T

na nukleotidnem mestu 1183 (Akyol in sod., 2004). Polimorfizem Ile58Thr je v populaciji zelo redek (Egan in sod., 2003). Veliko bolj pogost je polimorfizem v kodonu 16 (Sutton in sod., 2003), ki povzroči zamenjavo alanina v valin (Akyol in sod., 2004). Posledica polimorfizma C1183T je tako zmanjšan transport MnSOD v mitohondrije in posledično zmanjšana sposobnost odstranjevanja toksičnega superoksidnega aniona (Sutton in sod., 2003). Polimorfizem se nahaja v mitohondrijski tarčni sekvenci (MTS) na mestu -9, zato se ga označuje kot Ala-9Val polimorfizem MnSOD (Sutton in sod., 2003).

V eni izmed raziskav vpliva polimorfizma C1183T v genu za MnSOD na obolevnost za pljučnim rakom pri belcih so ugotovili povečano tveganje za pljučnega raka pri posameznikih s prisotnim polimorfnim alelom Val<sup>9</sup> (Wang in sod., 2001). Druga raziskava polimorfizma C1183T ni povezala s povečanim tveganjem za pljučnega raka, verjetno zaradi nizke frekvence alela Ala<sup>9</sup> pri populaciji Tajvancev (le 0.13) (Lin in sod., 2003). Polimorfizem C1183T so proučevali tudi v povezavi z drugimi vrstami raka, vendar so povečano tveganje povezali z normalnim alelom Ala<sup>9</sup> in ne s polimorfnim alelom Val<sup>9</sup>. Alel Ala<sup>9</sup> tako povezujejo s povečanim tveganjem za raka dojke (Egan in sod., 2003) ter z rakom prostate in mehurja (Ambrosone in sod., 2005). Razlike o vplivu polimorfizma na obolevnost za raka pripisujejo različni vlogi MnSOD v različnih populacijah in pri različnih tumorjih (Wang in sod., 2001). Kljub temu, da je MnSOD pomembna pri odstranjevanju ROS, ima lahko nastali vodikov peroksid karcinogen učinek (Ambrosone in sod., 1999). Alel Ala<sup>9</sup>, ki je povezan s povečano aktivnostjo MnSOD, prek tvorbe odvečnega vodikovega peroksida inducira oksidativni stres (Egan in sod., 2003). Po drugi strani pa lahko tudi povečana zmožnost odstranjevanja ROS zmanjša zaščitne mehanizme celice, kar privede do mutacij jedrne DNA (Ambrosone in sod., 1999).

V kodirajoči regiji gena za katalazo niso našli pogostega polimorfizma. V genu je le nekaj redkih polimorfizmov, ki so večinoma povezani z akatalazijo. V promotorski regiji gena za katalazo pa je na mestu -262 prisotna zamenjava nukleotida C v nukleotid T (Bastaki in sod., 2006). Polimorfizem C-262T vpliva na vezavo jedrnih proteinov in s tem na bazalno ekspresijo ter na nivoje katalaze v eritrocitih. Izsledki raziskav, ki so ugotovljale vpliv polimorfizma C-262T na nivo katalaze, so različni. Nivo izražanja katalaze naj bi glede na genotip padal od -262TT proti -262CT in -262CC. Posamezniki z manj pogostim

polimorfnim alelom -262T naj bi tako imeli višje nivoje katalaze kot homozigoti z normalnim alelom -262C, kar je bilo v skladu z višjo transkripcijsko aktivnostjo pri polimorfizmu C-262T (Forsberg in sod., 2001). Kljub temu pa so v drugi raziskavi poročali o najnižji aktivnosti katalaze pri genotipu -262TT in najvišji pri genotipu -262CC (Bastaki in sod., 2006).

Vpliva polimorfizma C-262T v genu za katalazo na obolenost za pljučnim rakom še niso raziskali. Znano pa je, da je karcinogen učinek vodikovega peroksida pri posameznikih z normalnim delovanjem encima MnSOD, a zmanjšano sposobnostjo odstranjevanja vodikovega peroksida z glutation peroksidazo in katalazo povečan (Ambrosone in sod., 1999).

V diplomski nalogi smo raziskali vpliv polimorfizma C1183T gena za MnSOD in vpliv polimorfizma C-262T gena za katalazo na tveganje za nastanek pljučnega raka pri slovenskih bolnikih. Oba polimorfizma smo določali z metodo genotipizacije, ki temelji na pomnoževanju dela genomske DNA z verižno reakcijo s polimerazo in cepljenju pomnoženega odseka z ustreznim encimom. Pri analizi polimorfizma C1183T MnSOD smo uporabili restrikcijsko endonukleazo *NgoM IV*, pri analizi polimorfizma C-262T katalaze pa restrikcijsko endonukleazo *Sma I*. Produkta cepljenja smo ločili z elektroforezo na 3% agaroznem gelu. Razlike v pogostosti obeh polimorfizmov pri bolnikih s pljučnim rakom in pri zdravih kontrolah smo ugotavljali s pomočjo statistične analize s testom  $\chi$ -kvadrat. Za ugotavljanje vpliva polimorfizma na povečanje ali zmanjšanje tveganja za nastanek pljučnega raka smo izračunali relativno tveganje in razmerje obetov.

## 2. Namen dela

V diplomski nalogi smo:

- določili genotip in pogostost polimorfnihi alelov MnSOD pri bolnikih s pljučnim rakom in pri kontrolni skupini. Primerjali smo porazdelitev genotipov MnSOD pri bolnikih s pljučnim rakom s porazdelitvijo v kontrolni skupini ter s tem ovrednotili vpliv polimorfizma C1183T MnSOD na nastanek pljučnega raka;
- primerjali smo porazdelitev genotipov MnSOD pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka s porazdelitvijo v kontrolni skupini ter s tem ovrednotili vpliv polimorfizma C1183T MnSOD na nastanek posameznega histološkega tipa pljučnega raka;
- ugotavljali, ali se porazdelitev genotipov MnSOD razlikuje glede na starost bolnikov s pljučnim rakom in ugotavljali vpliv polimorfizma C1183T MnSOD na nastanek pljučnega raka pri bolnikih starejših od 61 let;
- določili genotip in pogostost polimorfnihi alelov katalaze pri bolnikih s pljučnim rakom in pri kontrolni skupini. Primerjali smo porazdelitev genotipov katalaze pri bolnikih s pljučnim rakom s porazdelitvijo v kontrolni skupini ter s tem ovrednotili vpliv polimorfizma C-262T katalaze na nastanek pljučnega raka;
- primerjali smo porazdelitev genotipov katalaze pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka s porazdelitvijo v kontrolni skupini ter s tem ovrednotili vpliv polimorfizma C-262T katalaze na nastanek posameznega histološkega tipa pljučnega raka;



- ugotavljali, ali se porazdelitev genotipov katalaze razlikuje glede na starost bolnikov s pljučnim rakom in ugotavljali vpliv polimorfizma C-262T katalaze na nastanek pljučnega raka pri bolnikih starejših od 61 let;
- primerjali porazdelitev kombinacije genotipov MnSOD in katalaze pri bolnikih s pljučnim rakom in pri kontrolni skupini ter s tem ovrednotili skupni vpliv obeh polimorfizmov na nastanek pljučnega raka;

### **3. Delovna hipoteza**

Predvidevali smo, da je pri osebah, ki so nosilci polimorfni alelov MnSOD 1183T, zaradi zmanjšane zmožnosti odstranjevanja superoksidnega aniona, tveganje za nastanek pljučnega raka večje ter da je pri osebah, ki so nosilci polimorfni alelov katalaze -262T, zaradi povečane zmožnosti odstranjevanja vodikovega peroksida, tveganje za nastanek pljučnega raka manjše.

## **4. Pregled objav**

### **4.1. Reaktivne kisikove spojine**

Reaktivne kisikove spojine (ROS) nastajajo pri normalnem celičnem dihanju med redukcijo molekularnega kisika v mitohondrijski elektronski transportni verigi, v reakcijah s citokrom P450 oksidazo, ksantin oksidazo, lipooksigenazo in ciklooksigenazo (Li in sod., 2005), v vnetnih celicah z NADPH oksidazo (Hirvonen in sod., 2002), tvorijo pa se tudi med presnovo ksenobiotikov (Egan in sod., 2003) in estradiolov. V slednjem primeru se superoksidni anioni tvorijo v redoks ciklu kinonov, semikinonov in drugih intermediatov (Ambrosone in sod., 1999). Glavne ROS vključujejo superoksidni anion, vodikov peroksid, visoko reaktiven hidroksilni radikal in singletni kisik (Waris in sod., 2006).

#### **4.1.1. Superoksidni anion**

Superoksidni anion je prva reaktivna kisikova vrsta, ki nastane pri redukciji kisika v vodo (Kinnula in Crapo, 2003). Je relativno nestabilen, z razpolovno dobo nekaj milisekund, zaradi naboja pa stežka prehaja prek membran. Povzroča poškodbe aminokislin, s tem pa tudi izgubo funkcije proteina, saj lahko reagira s proteini, ki imajo prostetične skupine s prehodnimi kovinami (med drugim tudi s skupki FeS v mitohondrijih) (Comhair in Erzurum, 2002). V reakciji z dušikovim oksidom tvori peroksinitrit, ki inaktivira mitohondrijsko dihalno verigo (Sutton in sod., 2003). V fizioloških pogojih so mitohondriji glavno mesto nastanka superoksidnih anionov. Druga večja mesta nastanka so NADPH oksidazni encimatski sistem v nevtrofilcih, monocitih in makrofagih ter citokrom P450, monoamin oksidaza in lipooksigenaza. Superoksidni anion se tvori tudi v molibden hidroksilaznih reakcijah in v metabolizmu arahidonske kisline (Comhair in Erzurum, 2002) ter zaradi metabolnih motenj in izpostavitve toksinom (St. Clair in Kasarskis, 2003).

#### 4.1.2. Vodikov peroksid

Vodikov peroksid nastaja iz superoksidnega aniona z neencimatsko reakcijo ali z reakcijo, ki jo katalizira superoksid dismutaza (1).



Tvori se tudi z različnimi oksidaznimi encimi, ki vključujejo ksantin oksidazo, monoamin oksidazo in oksidazo aminokislin.

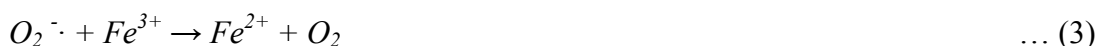
Encima mieloperoksidaza in eozinofilna peroksidaza vodikov peroksid oksidirata (2) (Comhair in Erzurum, 2002).



V reakcijah z mieloperoksidazo, ki se nahaja v granulah nevtrofilcev, nastaja hipokloridna kislina. Ta prispeva k poškodbam tkiva na mestu vnetja. Eozinofilna peroksidaza pa je v eozinofilcih, ki se aktivirajo pri številnih vrstah raka in po vstopu večjih patogenov. Encim oksidira bromid v hipobromidno kislino in tiocianat v hipotiocianit. Oba produkta sta citotoksična in predstavljata pomemben del imunske obrambe (Arnhold in sod., 2001).

#### 4.1.3. Hidroksilni radikal

Večina poškodb s superoksidnim anionom in vodikovim peroksidom je posledica nastanka hidroksilnih radikalov v seriji reakcij, ki jih katalizirajo prehodne kovine. V Haber-Weissovi reakciji (3) se  $Fe^{3+}$  reducira v  $Fe^{2+}$ .

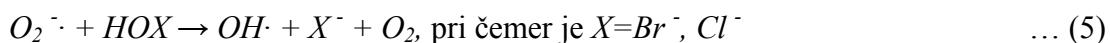


Tej reakciji sledi Fentonova reakcija (4), kjer  $Fe^{2+}$  katalizira transformacijo vodikovega peroksida v hidroksilni radikal.



Hidroksilni radikal nastaja tudi pri razpadu peroksinitritne kisline. Dušikov oksid je udeležen pri številnih regulatornih mehanizmih, kot toksični agens pa je prisoten v onesnaževalcih zraka in cigaretnem dimu. V reakciji s superoksidnim anionom nastaja nitrat, ki je močan oksidant. Kljub relativni stabilnosti nitrata, ta lahko protonira v peroksinitritno kislino (ONOOH), ki razpade v nitrat prek intermediatov hidroksilnega radikala in dušikovem dioksidu podobnim vrstam (Comhair in Erzurum, 2002).

Alternativna pot nastanka hidroksilnega radikala vključuje mieloperoksidazo in eozinofilno peroksidazo. Hidroksilni radikal se tvori v reakciji hipohalidne kisline s superoksidnim anionom (5) (Comhair in Erzurum, 2002).



#### 4.1.4. Singletni kisik

Tripletni kisik ( $^3O_2$ ) je običajna oblika kisika in je sestavina atmosfere. Tak kisik zelo počasi reagira z organskimi molekulami, izredno hitro pa z radikali (Japelj in Pečar, 2006). Singletni kisik ( $^1O_2$ ), ki naj bi nastajal v reakciji superoksidnega aniona z benzoil peroksidom (Mac Manus-Spencer in sod., 2006), pa za razliko od tripletnega kisika, zlahka reagira z večino organskih spojin in jih oksidira (Japelj in Pečar, 2006).

#### 4.2. Reaktivne kisikove spojine v bioloških sistemih

Biološki sistemi nenehno tvorijo ROS, s katerimi se zaščitijo pred mikroorganizmi. Na fiziološkem nivoju delujejo tako, da spremenijo ekstracelularni matriks in krvne žile ter stimulirajo izločanje mukusa in alveolarne popravljalne mehanizme. Delovanje ROS se na biokemijskem nivoju izraža z indukcijo apoptoze, regulacijo proliferacije celic, spremembo imunskega sistema v pljučih (Rahman in sod., 2006) in inaktivacijo antiproteaz, katerih funkcija je zaščita površine pljučnega epitela pred proteazami, ki se sproščajo z aktivacijo nevtrofilcev med fagocitozo (Balfour-Lynn, 1999). Povišan nivo

ROS na molekularnem nivoju pa prek aktivacije transkripcijskih faktorjev v pljučih sproži vnetne odgovore (Rahman in sod., 2006).

Kljub temu, da so ROS vključene v regulacijo celične homeostaze in signalizacijske poti, ki so povezane s proliferacijo in rastjo celic (Kinnula in Crapo, 2003), je njihovo delovanje citotoksično. Toksičnost izvira iz neravnovesja bioloških oksidantnih in antioksidantnih procesov, kar označujemo kot oksidativni stres (Cross in sod., 2002).

#### **4.2.1. Oksidativni stres**

Med oksidativnim stresom je homeostaza funkcij v celici odvisna od stopnje indukcije antioksidantnih encimov. Naravno prisotni antioksidanti ščitijo celice in tkiva pred ROS, ki nastajajo med normalnim metabolizmom celice. Na manjši oksidativni stres celice in tkiva odgovorijo s povišano antioksidantno obrambo, visok nivo ROS pa lahko antioksidantno obrambo zasiči (Comhair in Erzurum, 2002). Oksidativni stres moti delovanje elektronske transportne verige v mitohondrijih, ki tako sproščajo še večje količine ROS (Kinnula in Crapo, 2003).

Če ROS nastajajo v celicah in tkivih, ki imajo zadostno antioksidantno moč in sposobnost popravila, je škodljivih učinkov malo (Ambrosone in sod., 1999). V nasprotnem primeru prihaja zaradi njihovega presežka do poškodb celičnih komponent, saj reagirajo z lipidi v membranah, nukleotidi v DNA in sulfhidrilnimi skupinami proteinov (Waris in sod., 2006). Patofiziološke posledice tega so lahko obsežne poškodbe in vnetje (Comhair in Erzurum, 2002). Vir oksidantov na mestu vnetja vključuje aktivacijo vnetnih celic, aktivacijo NADPH oksidaze na membrani celice in aktivacijo sintaze dušikovega oksida v citosolu (Kinnula in Crapo, 2003). Vnetne celice proizvajajo superoksidne anione in hidroksilne radikale (Rahman in sod., 2006).

#### **4.2.2. Oksidativni stres in rak**

Oksidativne poškodbe DNA lahko vplivajo na začetek in napredovanje procesa karcinogeneze (Waris in sod., 2006). Zaradi neuravnovešenosti redoks stanja se spremeni okolje v celici, kar lahko sproži nastanek mutacij in/ali inaktivacijo tumorskih supresorskih genov. Aktivirajo se onkogeni, ki spremenijo rast in preživetje celic (Kinnula in sod., 2004). ROS, ki so povezane s hipoksijo, naj bi celo povečevale angiogenezo (Kinnula in Crapo, 2003).

Večina mutacij, ki jih inducirajo ROS, vključujejo spremembe gvanina, zaradi česar prihaja do transverzij gvanina v timin. Kljub temu, da lahko ROS spreminjajo vse štiri baze, se mutacije pojavljajo predvsem v povezavi s spremembami baznega para GC. V človeških tumorjih so transverzije gvanina v timin najpogostejše mutacije v supresorskem genu p53 (Waris in sod., 2006).

#### **4.2.3. Markerji oksidativnega stresa**

Eden od produktov, ki nastane ob prisotnosti hidroksilnih radikalov je 8-hidroksil-2'-deoksigvanozin. S pomočjo te modificirane baze se lahko ocenjuje nastanek hidroksilnih radikalov in stopnjo oksidativnega stresa v bioloških sistemih (Muñiz in sod., 2001). Oksidativni stres se meri tudi s pomočjo produktov oksidacije lipidov. Eden od končnih produktov oksidacije je malondialdehid (Kang in sod., 2003).

#### **4.2.4. Reaktivne kisikove spojine v pljučih**

Pljuča so direktno izpostavljena višjim nivojem kisika kot druga tkiva (Kinnula in sod., 2004). Zaradi velike površine in prekrvavljenosti so dovzetna za oksidativne poškodbe. Glavni vir ROS v pljučih vključuje nevtrofilce, eozinofilce in alveolarne makrofage ter alveolarne epitelne celice, epitelne celice bronhijev in endotelne celice. Nivo ROS v pljučih se poveča po izpostavitvi številnim kemičnim in fizičnim eksogenim agensom, ki vključujejo mineralne delce, dušikove okside, ozon, UV in ionizirajoče sevanje ter cigaretni dim (Rahman in sod., 2006).

### 4.3. Obrambni mehanizmi pljuč pred reaktivnimi kisikovimi spojinami

Oksidativne poškodbe bioloških molekul preprečujejo in/ali zmanjšujejo antioksidantni sistemi, ki so prisotni tudi v pljučih. Ti vključujejo številne mehanizme, ki bodisi razstrupijo reaktivne produkte bodisi jih pretvorijo v produkte, ki jih lahko odstranijo drugi antioksidanti (Comhair in Erzurum, 2002). Antioksidantni obrambni sistem vključuje antioksidante, antioksidantne encime in številne poti za popravilo oksidativnih poškodb. V celici so tudi specializirani proteini, ki so udeleženi v adaptacijo in zaščito celic pred oksidanti. To so peroksiredoksini, tioredoksini, glutaredoksini ter hem oksigenaze in reduktaze (Rahman in sod., 2006).

#### 4.3.1. Antioksidantni encimi

Glavni antioksidantni encimi so superoksid dismutaze (SOD), katalaza in glutation peroksidaza (Van Remmen in sod., 2003).

##### 4.3.1.1. Superoksid dismutaze

SOD so prisotne v vseh celicah. Pomembne so za zaščito celic in tkiv pred oksidativnim stresom. Vse SOD dismutirajo superoksidni anion v vodikov peroksid (6), ločijo pa se glede na strukturo, lokacijo, inducibilnost in zahtevo po kovinskem ionu (Rahman in sod., 2006).



Citosolna SOD (CuZnSOD) je homodimerni protein z molekulsko maso 32 kDa, ki ima v aktivnem centru Cu in Zn. Gen se nahaja na kromosomu 21 (območje 21q22). Promotorska regija vsebuje elemente zaporedja TATA ali CAAT in mesta, ki so bogata z GC (Rahman in sod., 2006).

Mitohondrijska SOD (MnSOD) je homotetramerni protein z molekulsko maso 88 kDa, ki ima v aktivnem centru Mn. Gen se nahaja na kromosomu 6 (območje 6q25). Promotorska regija je brez elementov zaporedja TATA ali CAAT, vsebuje pa mesta, ki so bogata z GC. MnSOD predstavlja 10-15% celotne SOD (Rahman in sod., 2006).

Ekstracelularna SOD (ECSOD) je glavna SOD v izločkih epitelnih celic v pljučih in intersticijskih prostorih. V velikih količinah je prisotna tudi v ožilju dihalnih poti. Tetramerni glikoprotein z molekulsko masa 135 kDa za aktivnost potrebuje Cu in Zn. Gen se nahaja na kromosomu 4 (območje 4p-q25). Promotorska regija je tako kot pri genu za MnSOD brez elementov zaporedja TATA ali CAAT, vsebuje pa mesta, ki so bogata z GC. Skupaj z glutation peroksidazo predstavlja pomembno prvo linijo obrambe pred vdihanimi ROS (Rahman in sod., 2006).

Vloga SOD je zaščita pljuč pred prostimi radikali, ki nastajajo pri normalnem celičnem metabolizmu, poleg tega pa preprečujejo napredovanje bolezni, ki so povezane z oksidanti. Aktivnost CuZnSOD in MnSOD je v pljučih nižja kot v drugih vitalnih organih (jetra, ledvice, srce, možgani), aktivnost ECSOD pa je v primerjavi z drugimi vitalnimi organi precej višja. Izražanje CuZnSOD je v pljučih najvišje v epitelu bronhijev, alveolarnem epitelu, celicah mezenhima, fibroblastih, arteriolah in endotelnih celicah kapilar. Izražanje MnSOD je visoko v respiratornem epitelu, alveolarnih epitelih celicah tipa II, alveolarnih makrofagih, fibroblastih intersticija in visceralni plevri. Izražanje ECSOD je visoko v epitelu bronhijev, alveolarnem epitelu, alveolarnih makrofagih in endotelnih celicah (Kinnula in Crapo, 2003).

Koncentracije SOD so odvisne od redoks statusa posameznega celičnega razdelka. V pljučih se v citoplazmi tvori manj superoksidnega aniona kot v celicah z visoko metabolno aktivnostjo (jetra in ledvice), zato je potreba po CuZnSOD nižja. Visok nivo ECSOD v pljučih je posledica gostega ožilja in večje izpostavljenosti izvenceličnim vnetjem. Mitohondriji so največji vir proizvodnje superoksidnega aniona, zato potrebujejo visoke nivoje MnSOD za vzdrževanje homeostaze (Kinnula in Crapo, 2003).



#### 4.3.1.2. Katalaza

V razgradnjo vodikovega peroksida v pljučih so udeleženi številni encimi, med katerimi sta najbolj pomembni katalaza in glutacion peroksidaza (Kinnula in Crapo, 2003). Sesalska katalaza je kompleks štirih identičnih podenot z molekulsko maso 60 kDa (skupna molekulska masa je 240 kDa). Vsaka podenota vsebuje skupino hema (Fe(III) - protoporfirin IX). 34 kb (kilobaz) dolg gen za katalazo je sestavljen iz 13 eksonov in se nahaja na kromosomu 11 (območje 11p13). Proksimalni promotor je brez zaporedja TATA, vsebuje pa številna CCAAT in GGGCGG zaporedja. Regija je bogata z GC (Quan in sod., 1986). Katalaza metabolizira majhne molekule, kot so vodikov peroksid (7) ter metil in etil hidroperoksid, ne katalizira pa razgradnje visoko molekularnih peroksidov, npr. produktov lipidne peroksidacije (Comhair in Erzurum, 2002).



Katalaza se nahaja predvsem v peroksisomih, a jo najdemo tudi v citoplazmi alveolarnih makrofagov. Izraža se v alveolarnih pnevmocitih tipa II, ki so najbolj odporne celice proti oksidantom in hiperoksiji, v endotelnih celicah, epitelnih celicah bronhijev in celicah gladkih mišic ter v ekstracelularni tekočini spodnjega respiratornega trakta (Kahlos in sod., 2001). Katalaza je najbolj učinkovita pri visokih koncentracijah vodikovega peroksida, pri nižjih koncentracijah vodikovega peroksida in drugih peroksidov pa ima pomembno vlogo glutationski sistem (Comhair in Erzurum, 2002).

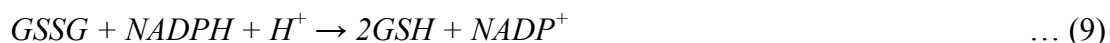
#### 4.3.1.3. Glutationski sistem

Glutationski sistem kot redukcijski sistem za vodikov peroksid dopolnjuje katalazo, učinkovitejši pa je pri odstranjevanju toksičnih peroksidov, ki vključujejo velike molekule lipidnih peroksidov, katere nastajajo po delovanju prostih radikalov na nenasičene lipidne membrane ali so produkt delovanja encima lipooksigenaze (Comhair in Erzurum, 2002). Glutation peroksidaze so družina od selena odvisnih in neodvisnih antioksidantnih encimov, ki se delijo v znotrajcelične in zunajcelične. Katalitično aktivnost določajo štirje atomi selena, ki so vezani na seleno-cisteinske ostanke (Rahman in sod., 2006). Njihovo delovanje je tesno povezano z vzdrževanjem reduciranega glutaciona z glutation reduktazo ter vzdrževanjem sinteze glutaciona z glutamat cistein ligazo in glutation sintazo (Kinnula in Crapo, 2003).

Glutation peroksidaza z glutationom (GSH) reducira vodikov peroksid v vodo (8).



V reakcijo vstopa reduciran glutation, ki služi kot donor elektronov. Oksidiran glutation (GSSG) se reducira nazaj v reakciji, ki jo katalizira glutation reduktaza (9) (Rahman in sod., 2006).



Zdrave celice vzdržujejo visoko razmerje GSH:GSSG, saj je tako glutation dostopen za pospešeno redukcijo vodikovega peroksida prek glutationskega sistema. Glutation pa lahko deluje tudi kot vodotopen antioksidant, ki prihaja v direkten stik z intermediati radikalov v neencimatskih reakcijah. Pri odstranjevanju superoksidnega aniona z glutationom nastajata radikal GS<sup>•</sup> in vodikov peroksid (Comhair in Erzurum, 2002).

### 4.3.2. Antioksidanti

Poleg klasičnih antioksidantnih encimov vsebujejo izločki epitelnih celic v pljučih še nizkomolekularne antioksidante in proteine, ki vključujejo mucin, glikoproteine, proteine, ki vežejo kovine (transferin, feritin, laktoferin, ceruloferin) ter lipotopne (vitamin E) in vodotopne (vitamin C) vitamine (Kinnula in sod., 2004). Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) je membransko vezan antioksidant, ki z odstranjanjem lipidnih peroksilnih radikalov ( $\text{LOO}\cdot$ ) ustavi verižno reakcijo lipidne peroksidacije. V reakciji postane vitamin E radikal, ki pa je manj reaktiven kot lipidni peroksilni radikali. Tudi vitamin C lahko direktno odstranjuje superoksidne anione in hidroksilne radikale. Pri reakciji se tvori semi-dehidro-askorbatni prosti radikal, ki se nato reducira z glutationom. Poleg superoksidnega aniona je vitamin C verjetno edini agens, ki lahko pretvarja  $\text{Fe}^{3+}$  v  $\text{Fe}^{2+}$ . Oksidantne ali antioksidantne lastnosti vitamina C so določene z zalogo železa, kjer presežek železa pospeši nastajanje oksidantov (Comhair in Erzurum, 2002).

Drugi neencimatski antioksidanti vključujejo  $\beta$ -karoten (odstranjuje superoksidne anione in peroksilne radikale), sečno kislino (odstranjuje hidroksilne in peroksilne radikale, superoksidne anione), glukozo (odstranjuje hidroksilne radikale), albumin (veže prehodne kovine) ter cistein in cistamin (oba donirata sulfhidrilne skupine) (Comhair in Erzurum, 2002). Antioksidanti v izločkih epitelnih celic respiratornega trakta niso razporejeni enakomerno. Proksimalni sloj izločkov je debelejši in vsebuje mucin ter visoke koncentracije sečne kisline. Distalni sloj je tanjši. Vsebuje visoke koncentracije askorbinske kisline in glutationa (Cross in sod., 2002).

#### **4.4. Polimorfizmi v genih za SOD**

##### **4.4.1. Polimorfizmi v genu za CuZnSOD**

V genu za CuZnSOD je preko 90 mutacij. Te so večinoma v povezavi z zmanjšanjem specifične aktivnosti encimov, ki jih kodirajo polimorfni geni. Polimorfizme gena so tako povezali z nevrološkimi boleznimi, njihovega vpliva na nastanek pljučnih bolezni pa še niso raziskali (Kinnula in Crapo, 2003).

##### **4.4.2. Polimorfizmi v genu za ECSOD**

Polimorfizem v genu za ECSOD povzroči zamenjavo aminokislina Arg v Gly na mestu 213, ki se nahaja v domeni za vezavo heparina. Posledica zamenjave je zmanjšanje vezave ECSOD na negativno nabite elemente v intersticiju, zaradi česar se poviša nivo ECSOD v serumu. V populaciji je polimorfizem Arg213Gly prisoten le v 2-6%, zato ga je težko povezovati z nastankom pljučnih bolezni. V genu za ECSOD sta bila opisana še dva polimorfizma, ki pa ne vplivata na sposobnost vezave ali na aktivnost encima (Kinnula in Crapo, 2003).

##### **4.4.3. Polimorfizma v genu za MnSOD**

V genu za MnSOD sta bila opisana dva polimorfizma. Polimorfizem Ile58Thr vključuje zamenjavo C v T na nukleotidnem mestu 339, polimorfizem Ala-9Val pa zamenjavo C v T na nukleotidnem mestu 1183 (Akyol in sod., 2004).

Polimorfizem C339T povzroči, da se izolevcin (Ile) na mestu 58 zamenja s treoninom (Thr) (St. Clair in Kasarskis, 2003). Polimorfizem zniža termostabilnost encima, medtem ko je protein z Ile bolj stabilen. Zaradi toplotne inaktivacije polimorfnega encima, se pri vnetju poveča stopnja oksidativnih poškodb celic (Borgstahl in sod., 1996). V populaciji je ta polimorfizem Ile58Thr redek, saj je prisoten v manj kot 5% (Egan in sod., 2003).

Veliko bolj pogost je polimorfizem v kodonu 16 (Sutton in sod., 2003), ki povzroči zamenjavo alanina (Ala) v valin (Val) (Akyol in sod., 2004). Polimorfizem se nahaja v mitohondrijski tarčni sekvenci (MTS) na mestu -9, zato se ga označuje kot Ala-9Val polimorfizem MnSOD (Sutton in sod., 2003).

Prekurzorski protein se sintetizira v citoplazmi in ima N-terminalno MTS, ki omogoča vstop prekurzorja MnSOD skozi translokazo zunanje (TOM) in translokazo notranje (TIM) membrane mitohondrija. Med transportom prekurzorskega proteina v mitohondrije se MTS odcepi z mitohondrijsko procesirajočo peptidazo, nakar se v matriksu sestavi aktiven tetramerni protein. Polimorfizem C1183T vpliva na sekundarno strukturo MTS. Računalniški model predvideva strukturo  $\alpha$ -heliksa za MTS, ki vsebuje Ala<sup>-9</sup> in strukturo  $\beta$ -ploskve za MTS, ki vsebuje Val<sup>-9</sup>. Zaradi zadrževanja Val<sup>-9</sup> oblike prekurzorja v notranji membrani mitohondrija, se ta obdrži v intermembranskem prostoru, kjer se začne delno zvijati. Ob prečkanju membrane se mora protein spet razviti, kar upočasni prenos prek membrane. Posledica polimorfizma C1183T je tako zmanjšan transport MnSOD v mitohondrije in posledično zmanjšana sposobnost odstranjevanja toksičnega superoksidnega aniona (Sutton in sod., 2003).

#### 4.4.3.1. Pogostost polimorfizma C1183T v genu za MnSOD

Frekvence alelov za polimorfizem C1183T MnSOD se pri Azijcih razlikujejo od frekvenc alelov pri beli rasi. Frekvenca alela Ala<sup>-9</sup> je pri prvih le 0.19, pri slednjih 0.54 (Bastaki in sod., 2006). Do razlik prihaja tudi znotraj posameznih ras. Znotraj bele rase je frekvenca alela Ala<sup>-9</sup> pri Laponcih 0.61, pri Fincih 0.47, pri Švedih 0.41 in pri Litovcih 0.56 (Van Landeghem in sod., 1999), med Azijci pa je frekvenca alela Ala<sup>-9</sup> pri Japoncih 0.12 (Ambrosone in sod., 1999), pri Kitajcih 0.30 (Van Landeghem in sod., 1999) in pri Tajvancih 0.13 (Lin in sod., 2003).

#### **4.5. Polimorfizem v genu za katalazo**

V kodirajoči regiji gena za katalazo niso našli pogostega polimorfizma. V genu je le nekaj redkih polimorfizmov, ki so večinoma povezani z akatalazijo. Pri tej motnji je nivo katalaze v eritrocitih le 0,2-4% normalnega nivoja (Forsberg in sod., 2001), v drugih tkivih pa aktivnost ni nujno zmanjšana. Manifestacija kliničnih znakov je redka in večinoma omejena na gangrene v ustni votlini (Quan in sod., 1986).

V promotorski regiji gena za katalazo pa je na mestu -262 prisotna zamenjava nukleotida C v nukleotid T (Bastaki in sod., 2006). Polimorfizem C-262T vpliva na vezavo jedrnih proteinov in s tem na bazalno ekspresijo ter na nivoje katalaze v eritrocitih. Izsledki raziskav, ki so ugotovljale vpliv polimorfizma C-262T na nivo katalaze, so različni. Nivo izražanja katalaze naj bi glede na genotip padal od -262TT proti -262CT in -262CC. Posamezniki z manj pogostim polimorfnim alelom -262T naj bi tako imeli višje nivoje katalaze kot homozigoti z normalnim alelom -262C, kar je bilo v skladu z višjo transkripcijsko aktivnostjo v primeru polimorfizma C-262T (Forsberg in sod., 2001). Kljub temu pa so v drugi raziskavi poročali o najnižji aktivnosti katalaze pri genotipu -262TT in najvišji pri genotipu -262CC (Bastaki in sod., 2006).

##### **4.5.1. Pogostost polimorfizma C-262T v genu za katalazo**

O polimorfizmu C-262T v genu za katalazo je bilo opravljenih zelo malo študij, znano pa je, da je frekvenca polimorfnege alela -262T pri Azijcih (0.09) nižja kot pri belcih (0.20) (Bastaki in sod., 2006), pri Švedih je bila frekvenca alela T 0.28 (Forsberg in sod., 2001).

## **4.6. Pljučni rak**

### **4.6.1. Epidemiološke značilnosti**

Pljučni rak je najpogostejša rakava bolezen v svetu in v Sloveniji. Po podatkih Registra raka za Slovenijo 2003 se je v Sloveniji incidenca pri moških večala do leta 1995. Takrat je pljučni rak predstavljal 22% vsega raka. Leta 1998 je pljučni rak predstavljal le še 19% vsega raka. Pri ženskah se je incidenca stalno večala, leta 1998 je pljučni rak predstavljal 5% vsega raka, skoraj toliko kot rak materničnega vratu, rak danke in celo želodčni rak. Razmerje moški proti ženskam je bilo 4:1 (Debeljak in sod., 2001).

V poročilu Registra raka za Slovenijo za leto 2003, je pljučni rak pri moških predstavljal 17,3% vsega raka, pri ženskah pa 5,6% vsega raka (Primic Žakelj, 2006). Ugotovili so, da obstajajo v Sloveniji utemeljeni razlogi za manjšanje incidence pljučnega raka pri moških in večanje le-te pri ženskah. Veča se odstotek bivših kadilcev med 45 let starimi in več. S kajenjem so najbolj obremenjeni moški, ki so bili rojeni med letoma 1920 in 1935 in tisti, ki so bili rojeni med letoma 1950 in 1960. Med njimi je bilo najmanj nekadilcev. Med ženskami v Sloveniji kajenje ni bilo nikoli razširjeno tako kot med moškimi. Prvi večji porast kadilk se je pojavil šele pri ženskah, ki so bile rojene po letu 1950. Največ so kadile ženske, rojene med letoma 1955 in 1965. Incidenca pri moških se je torej ustalila in v prihodnjih letih bo število moških bolnikov manjše (vendar bo med njimi več mlajših), število ženskih pa večje. Skupno število se bo počasi manjšalo (Debeljak in sod., 2001).

### **4.6.2. Razvoj pljučnega raka**

Karcinogeneza je proces, ki traja desetletja. Celice bronhialnega epitela se spreminjajo pod vplivom škodljivih dejavnikov iz okolja. Nastajajo okvare genov, ki so vpleteni v uravnavanje rasti, delitve, diferenciacije in umiranja celic (Debeljak in sod., 2001).

#### **4.6.3. Škodljivi dejavniki**

Do 90% pljučnega raka pri moških in do 78% pri ženskah lahko pripišemo kajenju cigaret. Kadilci 10-krat pogosteje zbolijo kot nekadilci. Obolevanje in umiranje je torej povezano s številom pokajenih cigaret in s trajanjem kajenja. Z nekoliko višjim tveganjem za nastanek pljučnega raka je povezan onesnažen zrak v mestih. Delavci v obratih azbesta in prebivalci v njihovi okolici so 5-krat pogosteje zbolevali za pljučnim rakom, če pa so hkrati kadili cigarete, je bila pogostost kar 50-krat večja. Dejavniki tveganja so tudi izpostavljenost arzenu, radioaktivnemu sevanju, radonu, policikličnim ogljikovodikom, gorčičnemu plinu, vinilkloridu, plastičnim snovem, kromu, niklju, beriliju, kadmiju in svincu. Omenjeni so tudi proizvodnja aluminija, uplinjanje premoga, proizvodnja koksa, topljenje železa in jekla, pleskarstvo, delo z močnimi anorganskimi kislinami, ki vsebujejo žveplovo kislino in kremenčev prah ( $\text{SiO}_2$ ). Pljučni rak je pogostejši pri ljudeh, ki pojedjo veliko živalske maščobe. Žlezni rak pljuč (adenokarcinom) je bil pogostejši pri ženskah s kratkimi menstrualnimi cikli, kar naj bi bilo povezano z višjimi koncentracijami estrogena. Za nastanek pljučnega raka je potrebna tudi prirojena nagnjenost, saj je v nekaterih družinah pljučni rak pogostejši kot v drugih (Debeljak in sod., 2001).

#### **4.6.4. Patološka klasifikacija pljučnih tumorjev**

Glavne oblike malignih epitelnih tumorjev so ploščatocelični (skvamozni), drobnocelični, velikocelični in žlezni (adenokarcinom) tumor (Debeljak in sod., 2001). Kreyberg je predlagal delitev tumorjev v dve skupini. Skupina Kreyberg I združuje ploščatocelične, drobnocelične in velikocelične tumorje, skupina Kreyberg II pa žlezne pljučne tumorje. Delitev je nastala na podlagi povezave histologije tumorja s kajenjem. Tumorji v skupini Kreyberg I so močno povezani s kajenjem, pri tumorjih iz skupine Kreyberg II pa je ta povezava šibka (Brownson in sod., 1998).



#### 4.7. Polimorfizmi v genih za antioksidantne encime in rak

V eni izmed raziskav vpliva polimorfizma C1183T v genu za MnSOD na obolevnost za pljučnim rakom pri belcih so ugotovili povečano tveganje za pljučnega raka pri posameznikih s prisotnim polimorfnim alelom Val<sup>9</sup> (Wang in sod., 2001). Druga raziskava polimorfizma C1183T ni povezala s povečanim tveganjem za pljučnega raka, rezultat pa naj bi bil posledica nizke frekvence alela Ala<sup>9</sup> pri populaciji Tajvancev (le 0.13) (Lin in sod., 2003).

Polimorfizem C1183T so proučevali tudi v povezavi z drugimi vrstami raka, vendar so povečano tveganje povezali z normalnim alelom Ala<sup>9</sup> in ne s polimorfnim alelom Val<sup>9</sup>. Alel Ala<sup>9</sup> tako povezujejo s povečanim tveganjem za raka dojke (Egan in sod., 2003) ter z rakom prostate in mehurja (Ambrosone in sod., 2005). Razlike o vplivu polimorfizma na obolevnost za raka pripisujejo različni vlogi MnSOD v različnih populacijah in pri različnih tumorjih (Wang in sod., 2001).

Kljub temu, da je MnSOD pomembna pri odstranjevanju ROS, ima lahko nastali vodikov peroksid karcinogen učinek (Ambrosone in sod., 1999). Alel Ala<sup>9</sup>, ki je povezan s povečano aktivnostjo MnSOD, prek tvorbe odvečnega vodikovega peroksida inducira oksidativni stres (Egan in sod., 2003). Po drugi strani pa lahko tudi povečana zmožnost odstranjevanja ROS zmanjša zaščitne mehanizme celice, kar privede do mutacij jedrne DNA (Ambrosone in sod., 1999).

Vpliva polimorfizma C-262T v genu za katalazo na obolevnost za pljučnim rakom še niso raziskali. Znano pa je, da je karcinogen učinek vodikovega peroksida pri posameznikih z normalnim delovanjem encima MnSOD, a zmanjšano sposobnostjo odstranjevanja vodikovega peroksida s katalazo in glutation peroksidazo povečan (Ambrosone in sod., 1999).

## 5. Material in metode

### 5.1. Preiskovanci

V preiskavo smo vključili 133 slovenskih bolnikov s pljučnim rakom, katerih značilnosti so prikazane v preglednici 1. Odvzem vzorcev krvi bolnikov je bil opravljen na Inštitutu za onkologijo v Ljubljani v letih 1994 in 1995.

Preglednica 1: Značilnosti proučevanih bolnikov s pljučnim rakom.

	(%)
<b>Število</b>	133
<b>Spol</b>	
Ženske	14 (10.5)
Moški	99 (74.4)
ni podatka	20 (15.0)
<b>Povprečna starost (<math>\pm</math>SD)</b>	62 $\pm$ 9
<b>Status kadilec/nekadilec</b>	
Kadilci	74 (55.6)
Nekadilci	9 (6.8)
ni podatka	50 (37.6)
<b>Histološki tip pljučnega raka</b>	
Kreyberg tip I	93 (69.9)
Kreyberg tip II	15 (11.3)
ni podatka	25 (18.8)

Analizo polimorfizma C-262T v genu za katalazo smo opravili samo na 118 vzorcih. Demografske in klinične značilnosti bolnikov (spol, povprečna starost, status kadilec/nekadilec, histološki tip pljučnega raka) se pri vzorcu bolnikov za analizo polimorfizma C-262T niso razlikovale od vzorca za analizo polimorfizma C1183T v genu za MnSOD.

Za primerjavo smo v raziskavo vključili 153 nesorodnih odraslih zdravih oseb, pri katerih ni bilo podatka o spolu, starosti in kadilskem statusu. Pri analizi polimorfizma C1183T v genu za MnSOD smo v kontrolno skupino vključili nekoliko manj oseb, in sicer 140. Odvzem vzorcev je bil opravljen na Zavodu za transfuzijsko medicino RS. Študijo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje.

## 5.2. Izolacija DNA

Analizo polimorfizma C1183T v genu za MnSOD in analizo polimorfizma C-262T v genu za katalazo smo opravili na že izoliranih vzorcih DNA. Genomska DNA je bila izolirana na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete v Ljubljani iz 5 mL periferne venske krvi. Izolacija je potekala po metodi z izsoljevanjem, ki jo je opisal Miller s sod. (1988).

## 5.3. Analiza polimorfizma C1183T v genu za MnSOD

Za ugotavljanje polimorfizma C1183T smo najprej z verižno reakcijo s polimerazo pomnožili ustrezní predel gena za MnSOD, pomnožene fragmente cepili z restrikcijsko endonukleazo *NgoM IV* (New England Biolabs) in dolžino cepljenih fragmentov določili z elektroforezo na agaroznem gelu. Verižna reakcija s polimerazo in določanje dolžin restrikcijskih fragmentov sta potekali pod že opisanimi pogoji (Akyol in sod., 2004).

### 5.3.1. Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Tehnika PCR omogoča pomnoževanje željenega zaporedja DNA s termostabilnim encimom *Taq* DNA polimeraza. Reakcijsko mešanico segrejemo na temperaturo, ki omogoča ločitev dveh verig DNA, nato pa temperaturo znižamo, da se na DNA vežejo specifični začetni oligonukleotidi. Po vezavi le-teh, s ponovnim dvigom temperature omogočimo optimalne pogoje za delovanje *Taq* DNA polimeraze. Ta vzdolž verige DNA na začetni oligonukleotid dodaja nukleotide, ki so komplementarni matrični DNA. V vsakem ciklu reakcije se količina produkta podvoji (Vollhardt in Shore, 2003).

### 5.3.1.1. Material

- GeneAmp 10X PCR Gold pufer (Applied Biosystem), pH 8.3 pri 25°C:
  - 500 mM KCl
  - 150 mM Tris-HCl
- MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystem), 25 mM
- mešanica dNTP (Applied Biosystem), 2.5 mM
- začetna oligonukleotida MnSOD-16F in MnSOD-16R (Proligo), 20pmol/μL.  
Nukleotidno zaporedje obeh je prikazano v preglednici 2.
- AmpliTaq Gold DNA polimeraza (Applied Biosystem), 5 enot/μL
- H<sub>2</sub>O

Preglednica 2: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov MnSOD (Akyol in sod., 2004).

začetni oligonukleotid	nukleotidno zaporedje
MnSOD-16F	5' ACCAACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG 3'
MnSOD-16R	5' GCGTTGATGTGAGGTTCCAG 3'

### 5.3.1.2. Metode

Z metodo PCR smo pomnožili predel gena za MnSOD med obema začetnima oligonukleotidoma.

Sestava reakcijske mešanice:

- 2 μL 10X pufra za PCR
- 1.44 μL MgCl<sub>2</sub>
- 12.06 μL H<sub>2</sub>O
- 1.6 μL dNTP
- 0.4 μL MnSOD-16F
- 0.4 μL MnSOD-16R
- 0.1 μL *Taq* DNA polimeraze
- 2 μL vzorca DNA

Končni volumen reakcijske mešanice je bil 20 μL. V vsako serijo smo vključili tudi negativno kontrolo, kateri smo namesto vzorca DNA dodali vodo.

Pogoji reakcije:

Začetna denaturacija je potekala 10 minut pri 94°C. Sledilo je 35 ciklov s 30 sekund dolgo denaturacijo pri 94°C, prileganjem začetnih oligonukleotidov 30 sekund pri 62°C in podaljševanjem verig DNA 40 sekund pri 72°C. Po končani sintezi smo reakcijsko mešanico inkubirali 7 minut pri 72°C, da so se fragmenti popolnoma podaljšali. Po koncu reakcije smo reakcijsko mešanico ohladili na 4°C.

### **5.3.2. Analiza produktov PCR z elektroforezo na agaroznem gelu**

Nabite molekule pri elektroforezi potujejo v električnem polju. Hitrost potovanja po nosilcu je odvisna od velikosti molekul, njihovega naboja in od lastnosti nosilca (Madigan in sod., 1997). Kot nosilec smo uporabili agarozni gel, pri katerem smo velikost por določili s koncentracijo agaroze. Za detekcijo DNA smo uporabili etidijev bromid, ki se vgradi v dvojno verigo DNA in pod UV svetlobo fluorescira (Madigan in sod., 1997).

#### **5.3.2.1. Material**

- pufer TBE
  - 0.098 M Tris-HCl
  - 0.089 M borova kislina ( $H_3BO_3$ )
  - 0.002 M EDTA
- agaroz (Sigma)
- pufer za nanos vzorcev
  - 0.05% ksilencianol
  - 0.05% bromfenol modro
  - 50% glicerol
- etidijev bromid (10mg/mL)
- dolžinski standard: pUC18, cepljen z restikcijskim encimom *HpaII*.  
Velikosti fragmentov: 501 bp, 489 bp, 404 bp, 353 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp, 110 bp, 89 bp, 67 bp, 34 bp in 26 bp.

### 5.3.2.2. Metode

Gel smo pripravili s segrevanjem 3% raztopine agaroze v puftru TBE in dodali 5  $\mu$ L etidijevega bromida. Vzorce smo nanašali na gel skupaj s pufrom za nanos vzorcev (5  $\mu$ L vzorca, 3  $\mu$ L pufra za nanos vzorcev). V prvi žepek gela smo nanесли 8  $\mu$ L dolžinskega standarda pUC18/*Hpa*II. Elektroforeza je potekala 20 minut pri napetosti 120V. Po končani elektroforezi smo gele presvetlili z UV svetlobo in jih dokumentirali s polaroidno fotografijo. Glede na znane dolžine fragmentov v lestvici dolžinskega standarda smo ocenili velikost pomnoženih fragmentov v posameznem vzorcu.

### 5.3.3. Analiza polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov

Restrikcijski encimi cepijo verigo DNA na tarčnih mestih, ki jih večinoma določa specifično zaporedje štirih do šestih baznih parov (Lewin, 1997). Genski polimorfizem izniči ali ustvari cepitveno mesto za določen restrikcijski encim, zato glede na prisotnost ali odsotnost cepitvenega mesta, po restrikciji dobimo različno število fragmentov. Dolžina fragmentov je odvisna od položaja cepitvenih mest.

#### 5.3.3.1. Material

– restrikcijska endonukleaza *Ngo*M IV (New England Biolabs)

– cepitveno mesto (\*):

5' ... G\*CCGGC ... 3'

3' ... CGGCC\*G ... 5'

### **5.3.3.2. Metode**

Vzorcem produktov PCR smo dodali 0.3µL restrikcijske endonukleaze *NgoM IV* in reakcijsko mešanico po navodilih proizvajalca (New England Biolabs) inkubirali čez noč pri 37°C.

### **5.3.4. Ugotavljanje dolžin produktov cepljenja z elektroforezo na agaroznem gelu**

#### **5.3.4.1. Material**

Dolžine produktov cepljenja z restrikcijsko endonukleazo *NgoM IV* smo ugotavljali z elektroforezo na agaroznem gelu. Uporabili smo reagente, ki so opisani pod točko 5.3.2.1.

#### **5.3.4.2. Metode**

S postopkom, ki je opisan pod točko 5.3.2.2. smo pripravili 3% agarozni gel. Na gel smo nanесли 10 µL vzorca, ki smo mu dodali 3 µL pufra za nanos vzorcev. V prvi žepček gela smo nanесли 8 µL dolžinskega standarda pUC18/*HpaII*. Elektroforeza in ocena dolžin produktov cepljenja v posameznem vzorcu sta potekali po postopku, ki je opisan pod točko 5.3.2.2.

## 5.4. Analiza polimorfizma C-262T v genu za katalazo

Za ugotavljanje polimorfizma C-262T smo najprej z verižno reakcijo s polimerazo pomnožili ustrezní predel gena za katalazo, pomnožene fragmente cepili z restrikcijsko endonukleazo *Sma* I (New England Biolabs) in dolžino cepljenih fragmentov določili z elektroforezo na agaroznem gelu. Verižna reakcija s polimerazo in določanje dolžin restrikcijskih fragmentov sta potekali pod že opisanimi pogoji (Forsberg in sod., 2001).

### 5.4.1. Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

#### 5.4.1.1. Material

- GeneAmp 10X PCR Gold pufer (Applied Biosystem), pH 8.3 pri 25°C:
  - 500 mM KCl
  - 150 mM Tris-HCl
- MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystem), 25 mM
- mešanica dNTP (Applied Biosystem), 2.5 mM
- začetna oligonukleotida CAT-262F in CAT-262R (Proligo), 20pmol/μL.  
Nukleotidno zaporedje obeh je prikazano v preglednici 3.
- AmpliTaq Gold DNA polimeraza (Applied Biosystem), 5 enot/μL
- H<sub>2</sub>O

Preglednica 3: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov CAT (Forsberg in sod., 2001).

začetni oligonukleotid	nukleotidno zaporedje
CAT-262F	5' TAAGAGCTGAGAAAGCATAGCT 3'
CAT-262R	5' AGAGCCTCGCCCCGCCGACCG 3'



#### 5.4.1.2. Metode

S tehniko PCR smo med obema začetnima oligonukleotidoma pomnožili predel gena za katalazo.

Sestava reakcijske mešanice:

- 2  $\mu\text{L}$  10X pufra za PCR
- 1.2  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$
- 12.3  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$
- 1.6  $\mu\text{L}$  dNTP
- 0.4  $\mu\text{L}$  CAT-262F
- 0.4  $\mu\text{L}$  CAT-262R
- 0.1  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA polimeraze
- 2  $\mu\text{L}$  vzorca DNA

Končni volumen reakcijske mešanice je bil 20  $\mu\text{L}$ . V vsako serijo smo vključili tudi negativno kontrolo, kateri smo namesto vzorca DNA dodali vodo.

Pogoji reakcije:

Začetna denaturacija je potekala 10 minut pri 94°C. Sledilo je 35 ciklov s 30 sekund dolgo denaturacijo pri 94°C, prileganjem začetnih oligonukleotidov 30 sekund pri 62°C in podaljševanjem verig DNA 40 sekund pri 72°C. Po končani sintezi smo reakcijsko mešanico inkubirali 7 minut pri 72°C, da so se fragmenti popolnoma podaljšali. Po koncu reakcije smo reakcijsko mešanico ohladili na 4°C.

## **5.4.2. Analiza produktov PCR z elektroforezo na agaroznem gelu**

### **5.4.2.1. Material**

Pri analizi produktov PCR smo uporabili reagente, ki so opisani pod točko 5.3.2.1.

### **5.4.2.2. Metode**

Za analizo produktov PCR smo uporabili metodo, ki je opisana pod točko 5.3.2.2.

## **5.4.3. Analiza polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov**

### **5.4.3.1. Material**

– restrikcijska endonukleaza *Sma* I (New England Biolabs)

– cepitveno mesto (\*):

5' ... CCC\*GGG ... 3'

3' ... GGG\*CCC ... 5'

### **5.4.3.2. Metode**

Vzorcem s produkti PCR smo dodali 0.3µL restrikcijske endonukleaze *Sma* I in reakcijsko mešanico po navodilih proizvajalca (New England Biolabs) inkubirali čez noč pri 25°C.

#### **5.4.4. Ugotavljanje dolžin produktov cepljenja z elektroforezo na agaroznem gelu**

##### **5.4.4.1. Material**

Dolžine produktov cepljenja z restrikcijsko endonukleazo *Sma* I smo ugotavljali z elektroforezo na agaroznem gelu. Uporabili smo reagente, ki so opisani pod točko 5.3.2.1.

##### **5.4.4.2. Metode**

S postopkom, ki je opisan pod točko 5.3.2.2. smo pripravili 3% agarozni gel. Na gel smo nanесли 10  $\mu\text{L}$  vzorca, ki smo mu dodali 3  $\mu\text{L}$  puфра za nanos vzorcev. V prvi žepek gela smo nanесли 8  $\mu\text{L}$  dolžinskega standarda pUC18/*Hpa*II. Elektroforeza in ocena dolžin produktov cepljenja v posameznem vzorcu sta potekali po postopku, ki je opisan pod točko 5.3.2.2.

## 5.5. Statistična analiza

### 5.5.1. Test $\chi$ -kvadrat

Kadar želimo vedeti, ali se ugotovljene frekvence razlikujejo od frekvenc, ki bi jih pričakovali na temelju hipoteze, pri statistični analizi uporabljamo test  $\chi$ -kvadrat (10).

$$\chi^2 = \frac{(f_u - f_p)^2}{f_p} \quad \dots (10)$$

Legenda:

$\chi^2$ =hi-kvadrat,  $f_u$ =ugotovljena frekvenca in  $f_p$ =pričakovana frekvenca

Oblika porazdelitve je odvisna od stopinj prostosti ( $m$ ), ki so določene s številom neodvisnih frekvenc v kontingenčni tabeli. Osnovni domnevi priredimo ničelno domnevo. Posledica zavrnitve ničelne domneve je sprejetje osnovne domneve. Pri analizi določimo še interval zaupanja in kritične meje intervala zaupanja (Adamič, 1989). V našem primeru smo izbrali stopnjo tveganja 5%, torej je interval zaupanja 95%. Kritični meji intervala sta 3.84 pri  $m=1$  in 5.99 pri  $m=2$ .

### 5.5.2. Relativno tveganje in razmerje obov

V medicini pogosto govorimo o binarnem izidu, zato je poleg testa  $\chi$ -kvadrat potrebno ugotoviti še kolikšna je povezava. Pri tem uporabljamo relativno tveganje (RR) in razmerje obov (OR). Relativno tveganje je razmerje tveganj v dveh skupinah, kjer je  $p_1$  tveganje v prvi skupini in  $p_2$  tveganje v drugi skupini. Tveganju za nek izid  $p$  določimo vrednost za nasprotni izid  $(1-p)$ , iz razmerja teh dveh števil pa izračunamo obete  $p/(1-p)$ .

Razmerje obetov (11) je kvocient obetov v dveh skupinah. Pri vrednostih  $1 < \Theta < \infty$ , so obeti za nek dogodek v prvi skupini večji kot v drugi skupini (Stare, 1998).

$$\theta = \frac{\frac{p_1}{1-p_1}}{\frac{p_2}{1-p_2}} \quad \dots (11)$$

Legenda:

$\Theta$ =razmerje obetov,  $p_1$ =verjetnost za nek dogodek v prvi skupini,  $1-p_1$ = verjetnost za nasprotni dogodek v prvi skupini,  $p_2$ =verjetnost za nek dogodek v drugi skupini in  $1-p_2$ = verjetnost za nasprotni dogodek v drugi skupini.

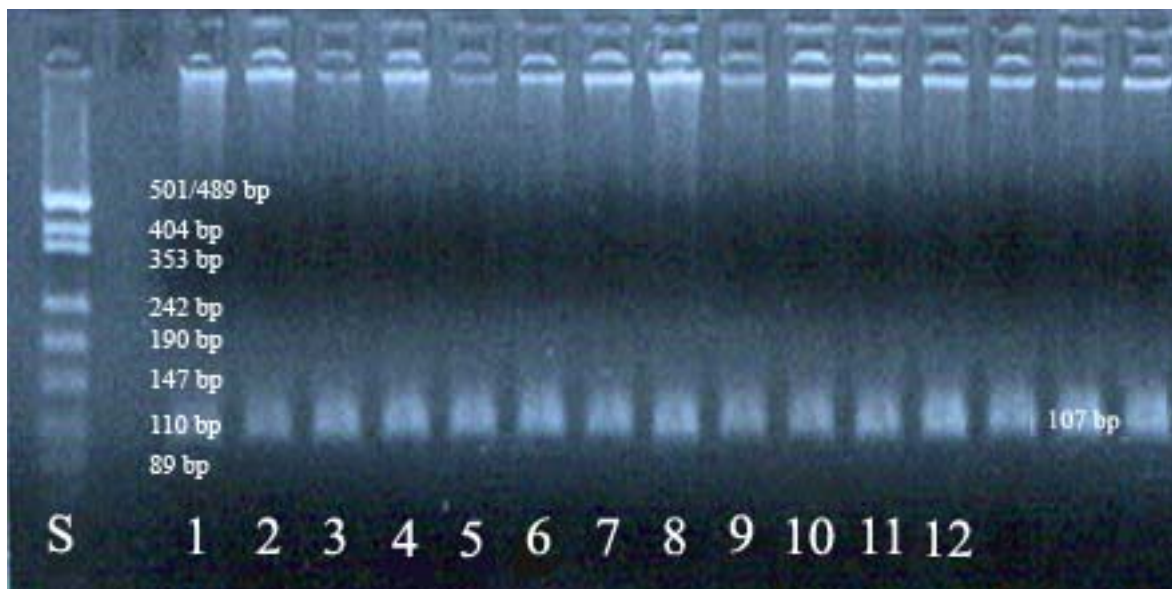
Razmerje obetov smo izračunali za vrednosti v tabelah 2x2 oz. pri računanju  $\chi$ -kvadrata z eno stopinjo prostosti ( $m=1$ ). Določili smo 5% stopnjo tveganja in izračunali kritično območje za vrednost razmerja obetov.

## 6. Rezultati

### 6.1. Rezultati genske analize na agaroznem gelu

#### 6.1.1. Analiza polimorfizma C1183T v genu za MnSOD

Z analizo pomnoženih fragmentov gena za MnSOD z elektroforezo na agaroznem gelu smo potrdili prisotnost 107 bp dolgih fragmentov DNA v naših vzorcih.



Slika 1: Analiza produktov verižne reakcije s polimerazo gena za MnSOD na agaroznem gelu.

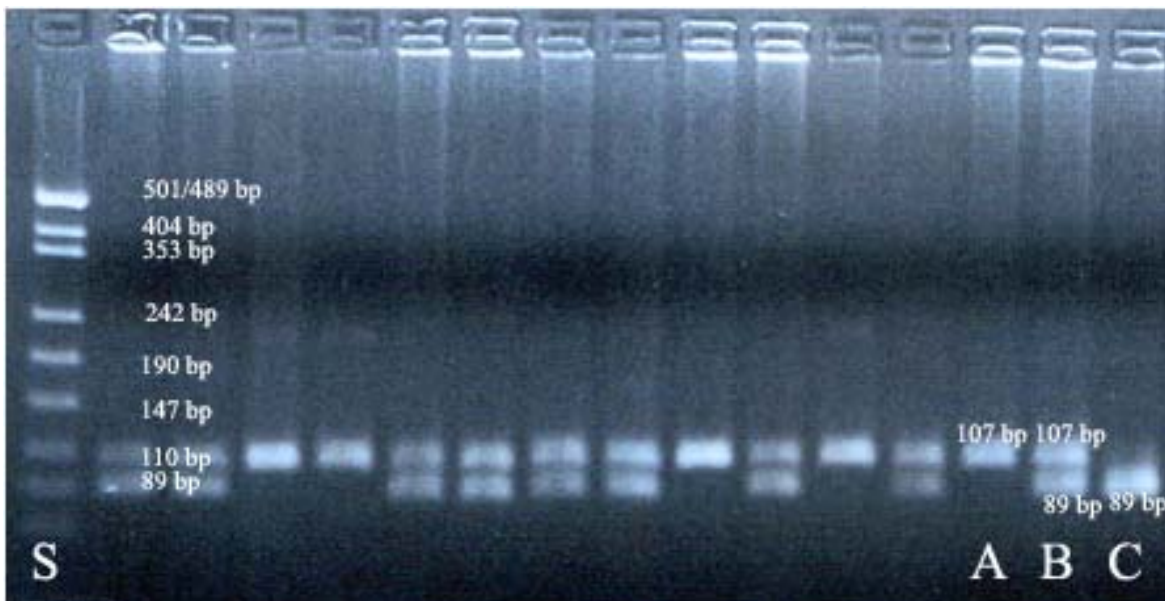
Legenda:

S=dolžinski standard pUC18/*Hpa*II

1-12=pomnoženi fragmenti dolžine 107 bp v posameznih vzorcih

Polimorfizem C1183T v genu za MnSOD povzroči zamenjavo Ala z Val v kodonu 16. Posamezniki z normalnim nukleotidnim zaporedjem v genu za MnSOD (kodon GCT) imajo cepitveno mesto za restrikcijsko endonukleazo *Ngo*M IV. Po cepljenju dobimo dva fragmenta DNA dolžine 89 bp in 18 bp.

Polimorfizem C1183T izniči cepitveno mesto za restrikcijsko endonukleazo *NgoM* IV. Pri heterozigotih za polimorfizem (Ala<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup>) tako po cepljenju dobimo tri fragmente dolžine 107 bp, 89 bp in 18 bp. Pri homozigotih za polimorfizem (Val<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup>), po cepljenju z *NgoM* IV, fragment dolžine 107 bp ostane necepljen (Akyol, 2004).



Slika 2: Analiza dolžine produktov cepljenja z restrikcijsko endonukleazo *NgoM* IV na agaroznem gelu.

Po cepljenju smo dobili fragmente dolžine 107 bp, 89 bp in 18 bp. Na agaroznem gelu sta vidna le fragmenta dolžine 107 bp in 89 bp.

Legenda:

S=dolžinski standard pUC18/*Hpa*II

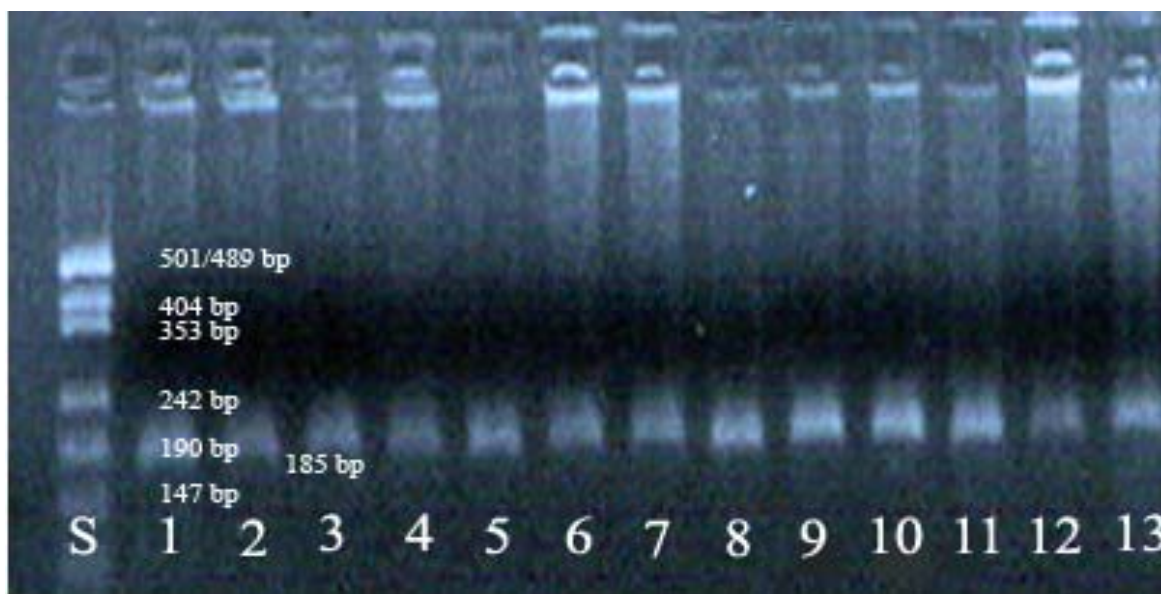
A=genotip Val<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup>

B=genotip Ala<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup>

C=genotip Ala<sup>-9</sup>/Ala<sup>-9</sup>

### 6.1.2. Analiza polimorfizma C-262T v genu za katalazo

Z analizo pomnoženih fragmentov gena za katalazo z elektroforezo na agaroznem gelu smo potrdili prisotnost 185 bp dolgih fragmentov DNA v naših vzorcih.



Slika 3: Analiza produktov verižne reakcije s polimerazo gena za katalazo na agaroznem gelu.

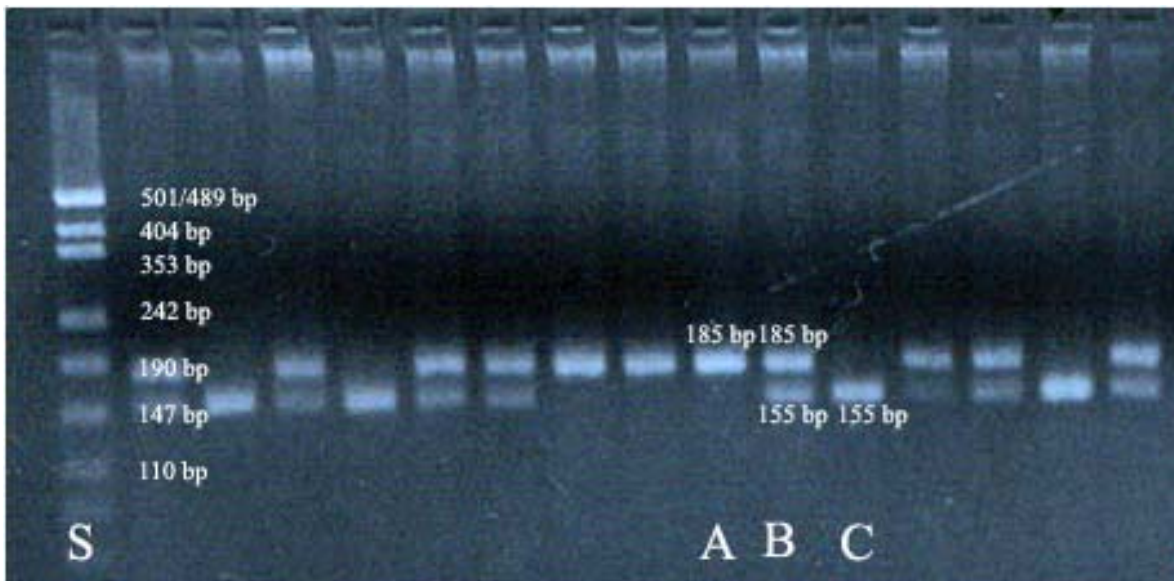
Legenda:

S=dolžinski standard pUC18/*Hpa*II

1-13=pomnoženi fragmenti dolžine 185 bp v posameznih vzorcih



Vzorci z normalnim nukleotidnim zaporedjem v genu za katalazo (-262C) imajo cepitveno mesto za restriksijsko endonukleazo *Sma* I. Po cepljenju produkta PCR tako dobimo dva fragmenta DNA dolžine 155 bp in 30 bp. Polimorfizem C-262T cepitveno mesto izniči. Pri heterozigotih za polimorfizem (-262CT) tako po cepljenju dobimo tri fragmente dolžine 185 bp, 155 bp in 30 bp. Pri homozigotih za polimorfizem (-262TT) po cepljenju dobimo necepljen fragment dolžine 185 bp (Forsberg, 2000).



Slika 4: Analiza dolžine produktov cepljenja z restriksijsko endonukleazo *Sma* I na agaroznem gelu.

Po cepljenju smo dobili fragmente dolžine 185 bp, 155 bp in 30 bp. Na agaroznem gelu sta vidna le fragmenta dolžine 185 bp in 155 bp.

Legenda:

S=dolžinski standard pUC18/*Hpa*II

A=genotip -262TT

B=genotip -262CT

C=genotip -262CC

## 6.2. Pogostost polimorfizma C1183T v genu za MnSOD

Preglednica 4: Frekvence genotipov za polimorfizem C1183T pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah.

	Število	Genotip (%)			$\chi^2(m=2)$	p
		Ala <sup>-9</sup> /Ala <sup>-9</sup>	Ala <sup>-9</sup> /Val <sup>-9</sup>	Val <sup>-9</sup> /Val <sup>-9</sup>		
<b>Pljučni rak</b>	133	26 (19.5)	76 (57.1)	31 (23.3)	1.271	0.530
<b>Kontrole</b>	140	26 (18.6)	73 (52.1)	41 (29.3)	-	-

Glede na prisotnost polimorfizma C1183T smo določili genotip za MnSOD. S primerjavo frekvenc genotipov smo ugotovili, da med porazdelitvijo genotipov pri bolnikih s pljučnim rakom in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni statistično značilnih razlik ( $\chi^2=1.271$ ,  $m=2$ ,  $p=0.530$ ).

Preglednica 5: Frekvence alelov za polimorfizem C1183T pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah.

	Število alelov	Alel (%)		$\chi^2(m=1)$	p
		Ala <sup>-9</sup>	Val <sup>-9</sup>		
<b>Pljučni rak</b>	266	128 (48.1)	138 (51.9)	0.531	0.466
<b>Kontrole</b>	280	125 (44.6)	155 (55.4)	-	-

Za analizo polimorfizma C1183T v genu za MnSOD smo izračunali frekvence alelov pri bolnikih s pljučnim rakom in jih primerjali z izračunanimi frekvencami alelov pri zdravih kontrolah. Frekvenca polimorfnega alela, ki nosi zapis za Val<sup>-9</sup> je bila pri bolnikih s pljučnim rakom 0.52, pri zdravih kontrolah pa 0.55. S primerjavo frekvenc alelov smo ugotovili, da med porazdelitvijo alelov pri bolnikih s pljučnim rakom in porazdelitvijo alelov pri zdravih kontrolah ni statistično značilnih razlik ( $\chi^2=0.531$ ,  $m=1$ ,  $p=0.466$ ).

Preglednica 6: Frekvence genotipov za polimorfizem C1183T pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in zdravih kontrolah.

	Število	Genotip (%)			$\chi^2(m=2)$	p
		Ala <sup>-9</sup> /Ala <sup>-9</sup>	Ala <sup>-9</sup> /Val <sup>-9</sup>	Val <sup>-9</sup> /Val <sup>-9</sup>		
<b>Pljučni rak</b>	133	26 (19.5)	76 (57.1)	31 (23.3)	1.271	0.530
<b>Kreyberg tip I</b>	93	20 (21.5)	49 (52.7)	24 (25.8)	0.489	0.783
Skvamozni karcinom	55	15 (27.3)	28 (50.9)	12 (21.8)	2.244	0.326
Drobnocelični karcinom	22	1 (4.5)	15 (68.2)	6 (27.3)	3.171	0.205
Velikocelični karcinom	16	4 (25.0)	6 (37.5)	6 (37.5)	1.238	0.538
<b>Kreyberg tip II</b>	15	3 (20.0)	8 (53.3)	4 (26.7)	0.050	0.975
<b>ni podatka</b>	25	3 (12.0)	19 (76.0)	3 (12.0)	5.063	0.079
<b>Kontrole</b>	140	26 (18.6)	73 (52.1)	41 (29.3)	-	-

Preverili smo tudi, ali se porazdelitev polimorfni genotipov razlikuje glede na histološki tip pljučnega raka. Bolnike smo združili glede na histološki tip pljučnega raka v skupino Kreyberg tip I, ki smo jo naprej delili v tri podskupine (skvamozni, drobnocelični in velikocelični karcinom), in skupino Kreyberg tip II (žlezni rak ali adenokarcinom). Pri bolnikih s pljučnim rakom in pri zdravih kontrolah smo izračunali frekvence posameznih genotipov za polimorfizem C1183T, pri bolnikih pa nas je zanimala tudi porazdelitev genotipov pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka.

Frekvenca genotipa Val<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup> je bila pri bolnikih s pljučnim rakom (0.23) statistično neznačilno nižja kot frekvenca pri zdravih kontrolah (0.29) ( $\chi^2=1.271$ , m=2, p=0.530). Med bolniki z znanim histološkim tipom raka je bila frekvenca genotipa Val<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup> najvišja pri velikoceličnem karcinomu (0.37) in najnižja pri skvamoznem karcinomu (0.22). Frekvenca genotipa Val<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup> je bila najnižja pri bolnikih, kjer histološki tip pljučnega raka ni bil znan (0.12), vendar se porazdelitev frekvenc genotipov pri teh bolnikih ni statistično značilno razlikovala od frekvence genotipov v kontrolni skupini, zato le-ti niso vplivali na končni rezultat. Frekvenca genotipa Val<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup> se pri tumorjih tipa Kreyberg tip I ni statistično značilno razlikovala od frekvence pri tumorjih tipa Kreyberg II (p>0.05, m=2). Tudi med porazdelitvijo genotipov pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni bilo statistično značilnih razlik (p>0.05, m=2).

Preglednica 7: Frekvence združenih genotipov za polimorfizem C1183T pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah.

	Število	Genotip (%)		$\chi^2(m=1)$	p	OR	CI
		Val <sup>-9</sup> /Val <sup>-9</sup>	Ala <sup>-9</sup> /Ala <sup>-9</sup> Ala <sup>-9</sup> /Val <sup>-9</sup>				
<b>Pljučni rak</b>	133	31 (23.3)	102 (76.7)	0.966	0.326	0.734	0.428-1.259
<b>Kreyberg tip I</b>	93	24 (25.8)	69 (74.2)	0.185	0.666	0.840	0.467-1.510
Skvamozni karcinom	55	12 (21.8)	43 (78.2)	0.767	0.381	0.674	0.326-1.395
Drobnocelični karcinom	22	6 (27.3)	16 (72.7)	0.003	0.953	0.905	0.342-2.414
Velikocelični karcinom	16	6 (37.5)	10 (62.5)	0.153	0.696	1.449	0.513-4.112
<b>Kreyberg tip II</b>	15	4 (26.7)	11 (73.3)	0.007	0.931	0.878	0.279-2.783
<b>ni podatka</b>	25	3 (12.0)	22 (88.0)	2.417	0.120	0.329	0.100-1.095
<b>Kontrole</b>	140	41 (29.3)	99 (70.7)	-	-	1	-

Za analizo polimorfizma C1183T v genu za MnSOD smo v eno skupino združili genotipe z enim ali dvema normalnima aleloma Ala<sup>-9</sup>. V tej skupini je bila frekvenca genotipov najnižja pri bolnikih z velikoceličnim karcinomom (0.62) in najvišja pri bolnikih, kjer histološki tip pljučnega raka ni bil znan (0.88). Porazdelitev frekvenc genotipov pri teh bolnikih se ni statistično značilno razlikovala od frekvence genotipov v kontrolni skupini, zato le-ti niso vplivali na končni rezultat. Frekvenca genotipa Val<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup> se pri tumorjih tipa Kreyberg tip I ni statistično značilno razlikovala od frekvence pri tumorjih tipa Kreyberg II ( $p > 0.05$ ,  $m=1$ ). S primerjavo frekvenc združenih genotipov smo ugotovili, da med porazdelitvijo genotipov pri bolnikih s pljučnim rakom in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni statistično značilnih razlik ( $\chi^2=0.966$ ,  $m=1$ ,  $p=0.326$ ). Tudi med porazdelitvijo genotipov pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni bilo statistično značilnih razlik ( $p > 0.05$ ,  $m=1$ ).

Ker smo hoteli ugotoviti, ali polimorfizem C1183T vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka, smo izračunali razmerja obetov. Pri tem smo upoštevali 95% interval zaupanja (CI). Ugotovili smo, da polimorfizem C1183T ne vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka (OR=0.734, 95% CI=0.428-1.259), kot tudi ne na tveganje za nastanek določenega histološkega tipa pljučnega raka.

Preglednica 8: Porazdelitev genotipov za polimorfizem C1183T v posameznem starostnem razredu pri bolnikih s pljučnim rakom.

	Število	Genotip	(%)	$\chi^2(m=1)$	p	OR	CI
		Val <sup>-9</sup> /Val <sup>-9</sup>	Ala <sup>-9</sup> /Ala <sup>-9</sup> Ala <sup>-9</sup> /Val <sup>-9</sup>				
<b>Starost bolnikov</b>							
≤60 let	36	9 (25.0)	27 (75.0)	-	-	1	-
>60 let	76	20 (26.3)	56 (73.7)	0.007	0.934	1.071	0.437-2.617

Preverili smo tudi, ali starost preiskovancev vpliva na porazdelitev genotipov za polimorfizem C1183T MnSOD. Bolnike s pljučnim rakom smo glede na starost razdelili v dva starostna razreda. Prvi je združeval bolnike mlajše od 60 let, v drugem pa so bili bolniki starejši od 61 let. Frekvenca genotipa Val<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup> je bila pri bolnikih mlajših od 60 let 0.25, pri bolnikih starejših od 61 let pa 0.26. Porazdelitev genotipov za MnSOD se med obema starostnima razredoma ni statistično značilno razlikovala ( $\chi^2=0.007$ ,  $m=1$ ,  $p=0.934$ ). Izračunali smo razmerje obolevnosti in ugotovili, da genotip Val<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup> ni statistično značilno vplival na tveganje za nastanek pljučnega raka pri bolnikih starejših od 61 let (OR=1.071, 95% CI=0.437-2.617).

### 6.3. Pogostost polimorfizma C-262T v genu za katalazo

Preglednica 9: Frekvence genotipov za polimorfizem C-262T pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah.

	Število	Genotip (%)			$\chi^2(m=2)$	p
		-262CC	-262CT	-262TT		
<b>Pljučni rak</b>	118	71 (60.2)	42 (35.6)	5 (4.2)	1.682	0.431
<b>Kontrole</b>	153	96 (62.7)	46 (30.1)	11 (7.2)	-	-

Glede na prisotnost polimorfizma C-262T smo določili genotip za katalazo. S primerjavo frekvenc genotipov smo ugotovili, da med porazdelitvijo genotipov pri bolnikih s pljučnim rakom in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni statistično značilnih razlik ( $\chi^2=1.682$ ,  $m=2$ ,  $p=0.431$ ).

Preglednica 10: Frekvence alelov za polimorfizem C-262T pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah.

	Število alelov	Alel (%)		$\chi^2(m=1)$	p
		-262C	-262T		
<b>Pljučni rak</b>	236	184 (78.0)	52 (22.0)	0.003	0.958
<b>Kontrole</b>	306	238 (77.8)	68 (22.2)	-	-

Za analizo polimorfizma C-262T v genu za katalazo smo izračunali frekvence alelov pri bolnikih s pljučnim rakom in jih primerjali z izračunanimi frekvencami alelov pri zdravih kontrolah. Frekvenca alela -262T pri bolnikih s pljučnim rakom se ni statistično značilno razlikovala od frekvence pri zdravih kontrolah ( $\chi^2=0.003$ ,  $m=1$ ,  $p=0.958$ ).

Preglednica 11: Frekvence genotipov za polimorfizem C-262T pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in zdravih kontrolah.

	Število	Genotip (%)			$\chi^2(m=2)$	p
		-262CC	-262CT	-262TT		
<b>Pljučni rak</b>	118	71 (60.2)	42 (35.6)	5 (4.2)	1.682	0.431
<b>Kreyberg tip I</b>	81	51 (63.0)	27 (33.3)	3 (3.7)	1.257	0.533
Skvamozni karcinom	48	30 (62.5)	16 (33.3)	2 (4.2)	0.643	0.725
Drobnocelični karcinom	20	11 (55.0)	8 (40.0)	1 (5.0)	0.853	0.653
Velikocelični karcinom	13	10 (76.9)	3 (23.1)	0 (-)	1.510	0.470
<b>Kreyberg tip II</b>	13	8 (61.5)	4 (30.8)	1 (7.7)	0.009	0.995
<b>ni podatka</b>	24	12 (50.0)	11 (45.8)	1 (4.2)	2.433	0.296
<b>Kontrole</b>	153	96 (62.7)	46 (30.1)	11 (7.2)	-	-

Tako kot pri analizi polimorfizma C1183T MnSOD smo preverili, ali se porazdelitev polimorfnihih genotipov razlikuje pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka. Bolnike smo združili glede na histološki tip pljučnega raka v skupino Kreyberg tip I, ki smo jo naprej delili v tri podskupine (skvamozni, drobnocelični in velikocelični karcinom), in skupino Kreyberg tip II (žlezni rak ali adenokarcinom). Pri bolnikih s pljučnim rakom in pri zdravih kontrolah smo izračunali frekvence posameznih genotipov za polimorfizem C-262T, pri bolnikih pa nas je zanimala tudi porazdelitev genotipov pri določenem histološkem tipu pljučnega raka.

Pri bolnikih s pljučnim rakom je bila frekvenca genotipa -262TT (0.04) statistično neznačilno nižja kot pri zdravih kontrolah (0.07) ( $\chi^2=1.682$ ,  $m=2$ ,  $p=0.431$ ). Frekvenca genotipa -262TT je bila pri tumorjih tipa Kreyberg I neznačilno nižja od frekvence pri tumorjih tipa Kreyberg II ( $p>0.05$ ,  $m=2$ ). Tudi med porazdelitvijo genotipov pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni bilo statistično značilnih razlik ( $p>0.05$ ,  $m=2$ ).

Preglednica 12: Frekvence združenih genotipov za polimorfizem C-262T pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah.

	Število	Genotip	(%)	$\chi^2(m=1)$	p	OR	CI
		-262CC	-262CT -262TT				
<b>Pljučni rak</b>	118	71 (60.2)	47 (39.8)	0.094	0.759	1.115	0.682-1.823
<b>Kreyberg tip I</b>	81	51 (63.0)	30 (37.0)	0.012	0.913	0.991	0.569-1.726
Skvamozni karcinom	48	30 (62.5)	18 (37.5)	0.020	0.888	1.011	0.521-1.964
Drobnocelični karcinom	20	11 (55.0)	9 (45.0)	0.181	0.670	1.378	0.551-3.450
Velikocelični karcinom	13	10 (76.9)	3 (23.1)	0.520	0.471	0.505	0.144-1.785
<b>Kreyberg tip II</b>	13	8 (61.5)	5 (38.5)	0.045	0.832	1.053	0.345-3.222
<b>ni podatka</b>	24	12 (50.0)	12 (50.0)	0.931	0.334	1.684	0.721-3.933
<b>Kontrole</b>	153	96 (62.7)	57 (37.3)	-	-	1	-

Za analizo polimorfizma C-262T v genu za katalazo smo v eno skupino združili genotipe z enim ali dvema polimorfnima aleloma -262T. Frekvenca genotipov v tej skupini je bila najnižja pri bolnikih z velikoceličnim karcinomom (0.23) in najvišja pri bolnikih, kjer histološki tip pljučnega raka ni bil znan (0.50). Porazdelitev frekvenc genotipov pri teh bolnikih se ni statistično značilno razlikovala od frekvence genotipov v kontrolni skupini, zato le-ti niso vplivali na končni rezultat. S primerjavo frekvenc združenih genotipov smo ugotovili, da med porazdelitvijo genotipov pri bolnikih s pljučnim rakom in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni statistično značilnih razlik ( $\chi^2=0.094$ ,  $m=1$ ,  $p=0.759$ ). Frekvenca genotipov z enim ali dvema polimorfnima aleloma -262T se pri tumorjih tipa Kreyberg I ni statistično značilno razlikovala od frekvence pri tumorjih tipa Kreyberg II ( $p>0.05$ ,  $m=1$ ). Tudi med porazdelitvijo genotipov pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni bilo statistično značilnih razlik ( $p>0.05$ ,  $m=1$ ).

Ker smo hoteli ugotoviti, ali polimorfizem C-262T vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka, smo izračunali razmerja obetov. Pri tem smo upoštevali 95% interval zaupanja (CI). Ugotovili smo, da polimorfizem C-262T ne vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka (OR=1.115, 95% CI=0.682-1.823), kot tudi ne na tveganje za nastanek določenega histološkega tipa pljučnega raka.



Preglednica 13: Porazdelitev genotipov za katalazo v posameznem starostnem razredu pri bolnikih s pljučnim rakom.

	Število	Genotip	(%)	$\chi^2(m=1)$	p	OR	CI
		-262CC	-262CT -262TT				
<b>Starost bolnikov</b>							
≤60 let	33	20 (60.6)	13 (39.4)	-	-	1	-
>60 let	65	39 (60.0)	26 (40.0)	0.026	0.872	1.026	0.439-2.391

Preverili smo tudi, ali starost preiskovancev vpliva na porazdelitev genotipov za polimorfizem C-262T pri katalazi. Bolnike s pljučnim rakom smo tako kot pri analizi polimorfizma C1183T MnSOD razdelili v dva starostna razreda. S primerjavo frekvenc genotipov smo ugotovili, da med porazdelitvijo genotipov med obema starostnima razredoma ni statistično značilnih razlik ( $\chi^2=0.026$ ,  $m=1$ ,  $p=0.872$ ). Izračunali smo razmerje obolevnosti in ugotovili, da genotip z enim ali dvema polimorfnima aleloma -262T ni statistično značilno vplival na tveganje za nastanek pljučnega raka pri bolnikih, ki so starejši od 61 let (OR=1.026, 95% CI=0.439-2.391).

#### 6.4. Pogostost kombinacije polimorfizma v genu za MnSOD in genu za katalazo

Preglednica 14: Porazdelitev kombinacije genotipov za MnSOD in katalazo pri bolnikih s pljučnim rakom in zdravih kontrolah.

Genotip		Število	(%)	$\chi^2(m=1)$	p	OR	CI
MnSOD	Katalaza	Kontrole	Pljučni rak				
Ala <sup>-9</sup> /Ala <sup>-9</sup>	-262CT	32(26.2)	39(33.3)	-	-	1	-
Ala <sup>-9</sup> /Val <sup>-9</sup>	-262TT						
Ala <sup>-9</sup> /Ala <sup>-9</sup>	-262CC	54(44.3)	50(42.7)	0.542	0.461	0.760	0.416-1.388
Ala <sup>-9</sup> /Val <sup>-9</sup>							
Val <sup>-9</sup> /Val <sup>-9</sup>	-262CT	14(11.5)	8(6.8)	1.633	0.201	0.469	0.179-1.235
	-262TT						
Val <sup>-9</sup> /Val <sup>-9</sup>	-262CC	22(18.0)	20(17.1)	0.310	0.577	0.746	0.349-1.594
		122	117				

Ker smo želeli preveriti, ali kombinacija polimorfizma C1183T v genu za MnSOD in polimorfizma C-262T v genu za katalazo vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka, smo skupni genotip, kjer naj bi bil oksidativni stres predvidoma najmanjši (genotip Ala<sup>-9</sup>/Ala<sup>-9</sup> in Ala<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup> pri MnSOD ter -262CT in -262TT pri katalazi), primerjali z ostalimi kombinacijami genotipov. Frekvenca kombinacije genotipa, kjer naj bi bil oksidativni stres predvidoma najmanjši, je bila pri bolnikih s pljučnim rakom (0.33) neznačilno višja od frekvence v kontrolni skupini (0.26). Najnižje frekvence, tako pri bolnikih kot pri zdravih kontrolah, so bile pri kombinaciji genotipa Val<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup> MnSOD ter -262CT in -262TT katalaze.

Ugotovili smo, da so razlike v porazdelitvi frekvenc med posameznimi kombinacijami genotipov za oba polimorfizma statistično neznačilne ( $p > 0.05$ ,  $m=1$ ). Posamezne kombinacije polimorfizma gena za MnSOD in polimorfizma gena za katalazo ne vplivajo na tveganje za nastanek pljučnega raka.

## 7. Razprava in sklepi

### 7.1. Razprava

Z metodo genotipizacije, ki temelji na pomnoževanju dela genomske DNA z verižno reakcijo s polimerazo in cepljenju pomnoženega odseka z ustreznim encimom, smo določali polimorfizem C1183T v genu za MnSOD in polimorfizem C-262T v genu za katalazo. V analizo smo vključili 133 bolnikov s pljučnim rakom in 153 nesorodnih odraslih zdravih oseb, ki so predstavljale kontrolno skupino.

#### 7.1.1. Vpliv polimorfizma C1183T v genu za MnSOD

Glede na prisotnost polimorfizma C1183T smo določili genotip za MnSOD. Za analizo polimorfizma smo pri bolnikih s pljučnim rakom in v kontrolni skupini ugotavljali frekvence normalnega alela Ala<sup>-9</sup> in frekvence polimorfnega alela Val<sup>-9</sup> MnSOD. Ugotovili smo, da med frekvencami alelov pri bolnikih s pljučnim rakom in frekvencami alelov v kontrolni skupini ni bilo statistično značilnih razlik ( $\chi^2=0.531$ ,  $m=1$ ,  $p=0.466$ ). Frekvenca alela Val<sup>-9</sup> MnSOD v kontrolni skupini (0.55) je primerljiva z izsledki drugih študij pri beli rasi. V raziskavah, ki so jih opravili Ambrosone in sod. (1999), Wang in sod. (2001) ter Bastaki in sod. (2006), so bile frekvence polimorfnega alela Val<sup>-9</sup> v kontrolni skupini v razponu od 0.46 do 0.50.

Z nadaljnjo raziskavo smo preverili, ali se porazdelitev polimorfnihih genotipov razlikuje pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka, zato smo bolnike združili glede na histološki tip pljučnega raka v skupino Kreyberg tip I in skupino Kreyberg tip II. Ugotovili smo, da se porazdelitev genotipov za polimorfizem C1183T pri bolnikih s pljučnim rakom ni statistično značilno razlikovala od porazdelitve v kontrolni skupini ( $\chi^2=1.271$ ,  $m=2$ ,  $p=0.530$ ). Frekvenca genotipa Val<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup> se pri tumorjih tipa Kreyberg I ni statistično značilno razlikovala od frekvence pri tumorjih tipa Kreyberg II ( $p>0.05$ ,  $m=2$ ). Tudi med porazdelitvijo genotipov pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni bilo statistično značilnih razlik ( $p>0.05$ ,  $m=2$ ).

Ker polimorfizem C1183T MnSOD zmanjša sposobnost odstranjevanja toksičnega superoksidnega aniona (Sutton in sod., 2003), nas je zanimal vpliv genotipa Val<sup>9</sup>/Val<sup>9</sup> na tveganje za nastanek pljučnega raka. Izsledki različnih študij glede vpliva polimorfnege alela Val<sup>9</sup> na tveganje za nastanek pljučnega raka niso enotni. Lin in sod. (2003) polimorfizma C1183T niso povezali s povečanim tveganjem za pljučnega raka, vendar rezultat pripisujejo nizki frekvenci alela Ala<sup>9</sup> (le 0.13), ki je značilna za Azijce. Raziskava, ki so jo opravili Wang in sod. (2001) pa je pokazala, da je prisotnost polimorfnege alela Val<sup>9</sup> povezana s povečanim tveganjem za pljučnega raka, zato smo posameznike z enim ali dvema normalnima aleloma Ala<sup>9</sup> združili v eno skupino. Z združitvijo genotipov smo skušali povečati tudi moč statistične analize, saj je bilo ponekod število homozigotov nizko. Ugotovili smo, da se porazdelitev genotipov pri bolnikih s pljučnim rakom ni statistično značilno razlikovala od porazdelitve genotipov v kontrolni skupini ( $\chi^2=0.966$ ,  $m=1$ ,  $p=0.326$ ). Frekvenca genotipa Val<sup>9</sup>/Val<sup>9</sup> se pri tumorjih tipa Kreyberg I ni statistično značilno razlikovala od frekvence pri tumorjih tipa Kreyberg II ( $p>0.05$ ,  $m=1$ ). Tudi med porazdelitvijo genotipov pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in porazdelitvijo genotipov v kontrolni skupini ni bilo statistično značilnih razlik ( $p>0.05$ ,  $m=1$ ). Ker smo hoteli ugotoviti, ali polimorfizem C1183T vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka, smo izračunali razmerja obetov in ugotovili, da polimorfizem C1183T ne vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka (OR=0.734, 95% CI=0.428-1.259), kot tudi ne na tveganje za nastanek določenega histološkega tipa pljučnega raka.

Preverili smo tudi, ali starost preiskovancev vpliva na porazdelitev genotipov za polimorfizem C1183T MnSOD. Bolnike s pljučnim rakom smo glede na starost razdelili v dva starostna razreda. Po izsledkih Wang in sod. (2001) naj bi bila povprečna starost obolelih za pljučnim rakom 60 let, zato smo to starost določili kot mejo med obema razredoma. Ugotovili smo, da med porazdelitvijo genotipov v obeh starostnih razredih ni bilo statistično značilnih razlik ( $\chi^2=0.007$ ,  $m=1$ ,  $p=0.934$ ) ter da genotip Val<sup>9</sup>/Val<sup>9</sup> ni statistično značilno vplival na tveganje za nastanek pljučnega raka pri bolnikih, ki so starejši od 61 let (OR=1.071, CI=0.437-2.617).

### 7.1.2. Vpliv polimorfizma C-262T gena za katalazo

Glede na prisotnost polimorfizma C-262T smo določili genotip za katalazo. Za analizo polimorfizma smo pri bolnikih s pljučnim rakom in v kontrolni skupini ugotavljali frekvence normalnega alela -262C in frekvence polimorfnege alela -262T katalaze. Ugotovili smo, da se frekvence alelov pri bolnikih s pljučnim rakom statistično neznačilno razlikujejo od frekvenc v kontrolni skupini ( $\chi^2=0.003$ ,  $m=1$ ,  $p=0.958$ ). Frekvenca polimorfnege alela -262T (0.22) je primerljiva z izsledki raziskave, ki so jo opravili Bastaki in sod. (2006) na zdravih kontrolah, pripadnikih bele rase, kjer je bila frekvenca 0.20.

Zanimalo nas je, ali se porazdelitev polimorfnege genotipov razlikuje pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka, zato smo bolnike združili glede na histološki tip pljučnega raka v skupino Kreyberg tip I in skupino Kreyberg tip II. Ugotovili smo, da med porazdelitvijo genotipov za polimorfizem C-262T pri bolnikih s pljučnim rakom in porazdelitvijo genotipov v kontrolni skupini ni bilo statistično značilnih razlik ( $\chi^2=1.682$ ,  $m=2$ ,  $p=0.431$ ). Frekvenca genotipa -262TT je bila pri tumorjih tipa Kreyberg I neznačilno nižja od frekvence pri tumorjih tipa Kreyberg II ( $p>0.05$ ,  $m=2$ ). Tudi med porazdelitvijo genotipov pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni bilo statistično značilnih razlik ( $p>0.05$ ,  $m=2$ ).

Posamezniki z manj pogostim alelom -262T, kjer so nivoji katalaze višji, naj bi imeli večjo sposobnost odstranjevanja toksičnega vodikovega peroksida (Forsberg in sod., 2001), zato smo v eno skupino združili genotipe z enim ali dvema polimorfnege aleloma -262T, s tem pa smo povečali tudi moč statistične analize. Ugotovili smo, da med porazdelitvijo genotipov pri bolnikih s pljučnim rakom in porazdelitvijo genotipov v kontrolni skupini ni bilo statistično značilnih razlik ( $\chi^2=0.094$ ,  $m=1$ ,  $p=0.759$ ). Frekvenca genotipov z enim ali dvema polimorfnege aleloma -262T se pri tumorjih tipa Kreyberg I ni statistično značilno razlikovala od frekvence pri tumorjih tipa Kreyberg II ( $p>0.05$ ,  $m=1$ ). Tudi med porazdelitvijo genotipov pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in pri zdravih kontrolah ni bilo statistično značilnih razlik ( $p>0.05$ ,  $m=1$ ). Zanimalo nas je, ali polimorfizem C-262T vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka, zato smo izračunali

razmerja obolevnosti. Ugotovili smo, da polimorfizem C-262T ne vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka (OR=1.115, 95% CI=0.682-1.823), kot tudi ne na tveganje za nastanek določenega histološkega tipa pljučnega raka.

Tako kot pri analizi polimorfizma C1183T MnSOD, smo preverili, ali starost preiskovancev vpliva na porazdelitev genotipov za polimorfizem C-262T katalaze. Ugotovili smo, da med porazdelitvijo genotipov v obeh starostnih razredih ni bilo statistično značilnih razlik ( $\chi^2=0.026$ ,  $m=1$ ,  $p=0.872$ ) ter da alel -262T ni značilno vplival na tveganje za nastanek pljučnega raka pri bolnikih, ki so starejši od 61 let (OR=1.026, CI=0.439-2.391).

### 7.1.3. Skupni vpliv polimorfizma C1183 MnSOD in C-262T katalaze

MnSOD in katalaza sta v dveh zaporednih reakcijah udeleženi v odstranjevanju reaktivnih kisikovih spojin. Zanimal nas je skupni vpliv polimorfizma C1183T MnSOD in polimorfizma C-262T katalaze na tveganje za nastanek pljučnega raka. MnSOD dismutira superoksidni anion v molekularni kisik in vodikov peroksid (Ambrosone in sod., 2005). Pri normalnem alelu Ala<sup>-9</sup> MnSOD je odstranjevanje toksičnega superoksidnega aniona bolj učinkovito kot pri polimorfnem alelu Val<sup>-9</sup> (Egan in sod., 2003), vendar pri tem nastajajo višje koncentracije vodikovega peroksida. Koncentracije le-tega se znižajo s pomočjo katalaze, ki vodikov peroksid razgradi v molekularni kisik in vodo (Rahman in sod., 2006). Pri alelu -262T je nivo katalaze, s tem pa tudi nivo razgradnje vodikovega peroksida, višji (Forsberg in sod., 2001).

Ker je pri normalnem alelu Ala<sup>-9</sup> MnSOD odstranjevanje toksičnega superoksidnega aniona učinkovito in pri polimorfnem alelu -262T katalaze sposobnost odstranjevanja nastalega vodikovega peroksida večja kot pri normalnem alelu -262C, je pri tej kombinaciji alelov MnSOD in katalaze oksidativni stres predvidoma najmanjši. Skupni genotip z enim ali dvema normalnima aleloma Ala<sup>-9</sup> MnSOD (genotip Ala<sup>-9</sup>/Ala<sup>-9</sup> in Ala<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup>) in z enim ali dvema polimorfnima aleloma -262T katalaze (genotip -262CT in -262TT) smo zato primerjali z ostalimi kombinacijami genotipov za oba polimorfizma. Ugotovili smo, da se porazdelitve frekvenc za kombinacijo genotipov MnSOD in katalaze

statistično neznačilno razlikujejo od frekvenc genotipov v skupini, kjer je oksidativni stres predvidoma najmanjši ( $p > 0.05$ ,  $m=1$ ). Kombinacije polimorfizmov C1183T MnSOD in C-262T katalaze, kjer so dvignjeni bodisi nivoji superoksidnega aniona bodisi nivoji vodikovega peroksida, ne vplivajo na tveganje za nastanek pljučnega raka.

V genih, ki so pomembni pri odstranjevanju ROS, so polimorfizmi pogosti. Prvo linijo obrambe pred vdihanimi ROS v pljučih predstavlja ECSOD (Rahman in sod., 2006). Ker pa je frekvenca polimorfizma Arg213Gly ECSOD v populaciji le 0.02-0.06 (Kinnula in Crapo, 2003), vpliva tega polimorfizma na tveganje za nastanek pljučnega raka nismo raziskovali. Pri odstranjevanju superoksidnega aniona poleg MnSOD in ECSOD sodeluje še CuZnSOD, vodikov peroksid pa poleg katalaze odstranjuje še glutation peroksidaza, zato bi bilo treba v nadaljnjih raziskavah upoštevati vse kombinacije polimorfizmov, ki lahko vplivajo na tveganje za nastanek pljučnega raka. Upoštevati bi morali tudi razlike v izpostavljenosti dejavnikom tveganja (cigaretni dim, UV in ionizirajoče sevanje, ozon, mineralni delci) in razlike v prehranskih navadah posameznikov/populacije (npr. količina vnesenih antioksidantov), ki jih v naši analizi nismo upoštevali.

Do 90% pljučnega raka pri moških in do 78% pri ženskah lahko pripišemo kajenju cigaret. Obolevanje in umiranje za pljučnim rakom je povezano s številom pokajenih cigaret in s trajanjem kajenja. (Debeljak in sod., 2001). Pri več kot tretjini bolnikov s pljučnim rakom nismo imeli podatka o kadilskem statusu, zato nismo mogli raziskati skupnega vpliva obeh polimorfizmov in kajenja. Bolnikov s pljučnim rakom tudi nismo razdelili po spolu, saj je bilo med njimi le 10% žensk, poleg tega pa ni bilo podatkov o spolu, starosti in kadilskem statusu za kontrolno skupino.

## 7.2. Sklepi

- Porazdelitev genotipov za polimorfizem C1183T gena za MnSOD se pri bolnikih s pljučnim rakom ni statistično značilno razlikovala od porazdelitve v kontrolni skupini ( $\chi^2=1.271$ ,  $m=2$ ,  $p=0.530$ ). Med frekvencami alelov pri bolnikih s pljučnim rakom in frekvencami alelov v kontrolni skupini ni bilo statistično značilnih razlik ( $\chi^2=0.531$ ,  $m=1$ ,  $p=0.466$ ). Polimorfizem MnSOD C1183T pri slovenskih bolnikih ne vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka (OR=0.734, 95% CI=0.428-1.259);
- Porazdelitev genotipov MnSOD pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka ni bila statistično značilno različna od porazdelitve pri zdravih kontrolah ( $p>0.05$ ,  $m=2$ ). Polimorfizem MnSOD C1183T pri slovenskih bolnikih ne vpliva na tveganje za nastanek določenega histološkega tipa pljučnega raka;
- Med porazdelitvijo genotipov v obeh starostnih razredih ni bilo statistično značilnih razlik ( $\chi^2=0.007$ ,  $m=1$ ,  $p=0.934$ ). Polimorfizem C1183T ne vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka pri bolnikih, ki so starejši od 61 let (OR=1.071, CI=0.437-2.617);
- Porazdelitev genotipov za polimorfizem C-262T gena za katalazo se pri bolnikih s pljučnim rakom ni statistično značilno razlikovala od porazdelitve v kontrolni skupini ( $\chi^2=1.682$ ,  $m=2$ ,  $p=0.431$ ). Med frekvencami alelov pri bolnikih s pljučnim rakom in frekvencami alelov v kontrolni skupini ni bilo statistično značilnih razlik ( $\chi^2=0.003$ ,  $m=1$ ,  $p=0.958$ ). Polimorfizem C-262 katalaze pri slovenskih bolnikih ne vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka (OR=1.115, 95% CI=0.682-1.823);
- Porazdelitev genotipov katalaze pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka ni bila statistično značilno različna od porazdelitve pri zdravih kontrolah ( $p>0.05$ ,  $m=2$ ). Polimorfizem C-262T katalaze pri slovenskih bolnikih ne vpliva na tveganje za nastanek določenega histološkega tipa pljučnega raka;



- Med porazdelitvijo genotipov katalaze v obeh starostnih razredih ni bilo statistično značilnih razlik ( $\chi^2=0.026$ ,  $m=1$ ,  $p=0.872$ ). Polimorfizem C-262T gena za katalazo ne vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka pri bolnikih, ki so starejši od 61 let (OR=1.026, CI=0.439-2.391);
- Porazdelitev kombinacije genotipov za oba proučevana polimorfizma C1183T MnSOD in C-262T katalaze se ni statistično značilno razlikovala od porazdelitve v skupini s predvidenim najnižjim oksidativnim stresom ( $p>0.05$ ,  $m=1$ ). Kombinacije polimorfizmov C1183T MnSOD in C-262T katalaze, pri katerih so lahko dvignjeni bodisi nivoji superoksidnega aniona bodisi nivoji vodikovega peroksida, ne vplivajo na tveganje za nastanek pljučnega raka pri slovenskih bolnikih.

Delovno hipotezo smo ovrgli. Polimorfizem C1183T MnSOD in polimorfizem C-262T katalaze ne vplivata na tveganje za nastanek pljučnega raka pri slovenskih bolnikih.

## 8. Povzetek

Pljučni rak je najpogostejša rakava bolezen v svetu in v Sloveniji. Po podatkih Registra raka za Slovenijo 2003 se je v Sloveniji incidenca pri moških večala do leta 1995. Takrat je pljučni rak predstavljal 22% vsega raka. Leta 1998 je pljučni rak predstavljal le še 19% vsega raka. Pri ženskah se je incidenca stalno večala, leta 1998 je pljučni rak predstavljal 5% vsega raka, skoraj toliko kot rak materničnega vratu, rak danke in celo želodčni rak. Razmerje moški proti ženskam je bilo 4:1 (Debeljak in sod., 2001). V poročilu Registra raka za Slovenijo za leto 2003, je pljučni rak pri moških predstavljal 17,3% vsega raka, pri ženskah pa 5,6% vsega raka (Primic Žakelj, 2006).

Pljuča so direktno izpostavljena višjim nivojem kisika kot druga tkiva (Kinnula in sod., 2004). Oksidativne poškodbe bioloških molekul preprečujejo in/ali zmanjšujejo antioksidantni sistemi, ki so prisotni tudi v pljučih. Ti vključujejo številne mehanizme, ki bodisi razstrupijo reaktivne produkte bodisi jih pretvorijo v produkte, ki jih lahko odstranijo drugi antioksidanti (Comhair in Erzurum, 2002). Antioksidantni obrambni sistem vključuje antioksidante, antioksidantne encime in številne poti za popravilo oksidativnih poškodb (Rahman in sod., 2006). Glavni antioksidantni encimi so superoksid dismutaze (SOD), katalaza in glutation peroksidaza (Van Remmen in sod., 2003). Poleg teh vsebujejo izločki epitelnih celic v pljučih še nizkomolekularne antioksidante in proteine, ki vključujejo mucin, glikoproteine, proteine, ki vežejo kovine (transferin, feritin, laktoferin, ceruloferin) ter lipotopne (vitamin E) in vodotopne (vitamin C) vitamine (Kinnula in sod., 2004).

Polimorfizmi v genih za antioksidantne encime, ki se kažejo v spremenjeni sposobnosti odstranjevanja ROS, lahko vplivajo na tveganje za nastanek pljučnega raka. Posledica polimorfizma C1183T v genu za MnSOD je zmanjšan transport MnSOD v mitohondrije (polimorfizem se nahaja v mitohondrijski tarčni sekvenci) in posledično zmanjšana sposobnost odstranjevanja toksičnega superoksidnega aniona (Sutton in sod., 2003). Polimorfizem C-262T v genu za katalazo pa vpliva na vezavo jedrnih proteinov, s tem pa na bazalno ekspresijo in nivoje katalaze (Forsberg in sod., 2001).

V diplomski nalogi smo raziskali vpliv polimorfizma C1183T gena za MnSOD in vpliv polimorfizma C-262T gena za katalazo na tveganje za nastanek pljučnega raka pri slovenskih bolnikih. Oba polimorfizma smo določali z metodo genotipizacije, ki temelji na pomnoževanju dela genomske DNA z verižno reakcijo s polimerazo in cepljenju pomnoženega odseka z ustreznim encimom. Pri analizi polimorfizma C1183T MnSOD smo uporabili restriksijsko endonukleazo *NgoM IV*, pri analizi polimorfizma C-262T katalaze pa restriksijsko endonukleazo *Sma I*. Produkta cepljenja smo ločili z elektroforezo na 3% agaroznem gelu. Razlike v pogostosti obeh polimorfizmov pri bolnikih s pljučnim rakom in pri zdravih kontrolah smo ugotavljali s pomočjo statistične analize s testom  $\chi$ -kvadrat. Za ugotavljanje vpliva polimorfizma na povečanje ali zmanjšanje tveganja za nastanek pljučnega raka smo izračunali relativno tveganje in razmerje obolevnosti.

Med porazdelitvijo genotipov za polimorfizem C1183T MnSOD pri bolnikih s pljučnim rakom in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni statistično značilnih razlik ( $\chi^2=1.271$ ,  $m=2$ ,  $p=0.530$ ). Frekvenca polimorfnega alela Val<sup>9</sup> je bila pri bolnikih s pljučnim rakom 0.52, pri zdravih kontrolah pa 0.55. Porazdelitev alelov pri bolnikih s pljučnim rakom se ni statistično značilno razlikovala od porazdelitve alelov pri zdravih kontrolah ( $\chi^2=0.531$ ,  $m=1$ ,  $p=0.466$ ). Tudi med porazdelitvijo genotipov pri posameznem histološkem tipu pljučnega raka in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni bilo statistično značilnih razlik ( $p>0.05$ ,  $m=2$ ). Porazdelitev genotipov se med obema starostnima razredoma bolnikov s pljučnim rakom ni statistično značilno razlikovala ( $\chi^2=0.007$ ,  $m=1$ ,  $p=0.934$ ). Ugotovili smo, da polimorfizem C1183T ne vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka (OR=0.734, 95% CI=0.428-1.259), kot tudi ne na tveganje za nastanek določenega histološkega tipa pljučnega raka. Polimorfizem C1183T MnSOD ni statistično značilno vplival na tveganje za nastanek pljučnega raka pri bolnikih starejših od 61 let (OR=1.071, 95% CI=0.437-2.617).

Med porazdelitvijo genotipov za polimorfizem C-262T katalaze pri bolnikih s pljučnim rakom in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni statistično značilnih razlik ( $\chi^2=1.682$ ,  $m=2$ ,  $p=0.431$ ). Frekvenca polimorfnega alela -262T pri bolnikih s pljučnim rakom se ni statistično značilno razlikovala od frekvence pri zdravih kontrolah (0.22) ( $\chi^2=0.003$ ,  $m=1$ ,  $p=0.958$ ). Tudi med porazdelitvijo genotipov pri posameznem

histološkem tipu pljučnega raka in porazdelitvijo genotipov pri zdravih kontrolah ni bilo statistično značilnih razlik ( $p > 0.05$ ,  $m=2$ ). Porazdelitev genotipov se med obema starostnima razredoma bolnikov s pljučnim rakom ni statistično značilno razlikovala ( $\chi^2=0.026$ ,  $m=1$ ,  $p=0.872$ ). Ugotovili smo, da polimorfizem C-262T ne vpliva na tveganje za nastanek pljučnega raka (OR=1.115, 95% CI=0.682-1.823), kot tudi ne na tveganje za nastanek določenega histološkega tipa pljučnega raka. Polimorfizem C-262T katalaze ni statistično značilno vplival na tveganje za nastanek pljučnega raka pri bolnikih, ki so starejši od 61 let (OR=1.026, 95% CI=0.439-2.391).

Skupni genotip, kjer naj bi bil oksidativni stres predvidoma najmanjši (genotip Ala<sup>-9</sup>/Ala<sup>-9</sup> in Ala<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup> pri MnSOD ter -262CT in -262TT pri katalazi), smo primerjali z ostalimi kombinacijami genotipov. Frekvenca kombinacije genotipa, kjer naj bi bil oksidativni stres predvidoma najmanjši, je bila pri bolnikih s pljučnim rakom (0.33) neznačilno višja od frekvenca v kontrolni skupini (0.26). Najnižje frekvence, tako pri bolnikih kot pri zdravih kontrolah, so bile pri kombinaciji genotipa Val<sup>-9</sup>/Val<sup>-9</sup> MnSOD ter -262CT in -262TT katalaze. Razlike v porazdelitvi frekvenc med posameznimi kombinacijami genotipov za oba polimorfizma so statistično neznačilne ( $p > 0.05$ ,  $m=1$ ). Posamezne kombinacije polimorfizma gena za MnSOD in polimorfizma gena za katalazo ne vplivajo na tveganje za nastanek pljučnega raka.

## 9. Viri

1. Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izdaja. Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 195 str.
2. Akyol O., Canatan H., Yilmaz H.R., Yuce H., Ozyurt H., Sogut S., Gulec M., Elyas H. 2004. PCR/RFLP-based cost-effective identification of SOD2 signal (leader) sequence polymorphism (Ala-9Val) using *NgoM IV*: a detailed methodological approach. *Clinica Chimica Acta*, 345: 151-159.
3. Ambrosone C.B., Ahn J., Singh K.K., Rezaishiraz H., Furberg H., Sweeney C., Coles B., Trovato A. 2005. Polymorphisms in Genes Related to Oxidative Stress (MPO, MnSOD, CAT) and Survival After Treatment for Breast Cancer. *Cancer research*, 65: 1105-1111.
4. Ambrosone C.B., Freudenheim J.L., Thompson P.A., Bowman E., Vena J.E., Marshall J.R., Graham S., Laughlin R., Nemoto T., Shields P.G. 1999. Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Genetic Polymorphisms, Dietary Antioxidants, and Risk of Breast Cancer. *Cancer research*, 59: 602-606.
5. Arnhold J., Furtmüller P.G., Regelsberger G., Obinger C. 2001. Redox properties of the couple compound I/native enzyme of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *European journal of biochemistry*, 268: 5142-5148.
6. Balfour-Lynn I.M. 1999. The protease-antiprotease battle in the cystic fibrosis lung. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 92:23-30.

7. Bastaki M., Huen K., Manzanillo P., Chande N., Chen C., Balmes J.R., Tager I.B., Holland N. 2006. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenetics and genomics*, 16: 279-286.
8. Borgstahl G.E., Parge H.E., Hickey M.J., Johnson M.J., Boissinot M., Hallewell R.A., Lepock J.R., Cabelli D.E., Tainer J.A. 1996. Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry*, 35: 4287-4297.
9. Brownson R.C., Alavanja M.C.R., Caporaso N., Simones E.J., Chang J.C. 1998. Epidemiology and Prevention of Lung Cancer in Nonsmokers. *Epidemiologic Reviews*, 20: 218-236.
10. Comhair S.A.A., Erzurum S.C. 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 283: 246-255.
11. Cross C.E., Valacchi G., Schock B., Wilson M., Weber S., Eiserich J., van der Vliet A. 2002. Environmental Oxidant Pollutant Effects on Biologic Systems. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 166: 544-550.
12. Debeljak A., Triller N., Kecelj P., Pompe-Kirn V., Rott T., Osolnik K., Cesar R., Požek I., Marčun R., Juvan-Žavbi M., Morvin-Stanovnik T., Kandare F., Fležar M., Koren I., Letonja S., Kern I., Vidmar S., Kovač V., Lahajnar S., Šifrer F., Turel M. 2001. Smernice za internistično obravnavo bolnika s pljučnim rakom. *Zdravniški vestnik*, 71: 353-417.
13. Egan K.M., Thompson P.A., Titus-Ernstoff L., Moore J.H., Ambrosone C.B. 2003. MnSOD polymorphism and breast cancer in a population-based case-control study. *Cancer Letters*, 199: 27-33.

14. Forsberg L., Lyrenäs L., de Faire U., Morgenstern R. 2001. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radical Biology & Medicine*, 30: 500-505.
15. Hirvonen A., Tuimala J., Ollikainen T., Linnainmaa K., Kinnula V. 2002. Manganese superoxide dismutase genotypes and asbestos-associated pulmonary disorders. *Cancer Letters*, 178: 71-74.
16. Japelj B., Pečar S. 2006. Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja. *Farmacevtski vestnik*, 57: 131-139.
17. Kahlos K., Soini Y., Sormunen R., Kaartenaho-Wiik R., Pääkkö P., Linnainmaa K., Kinnula V.L. 2001. Expression and Prognostic Significance of Catalase in Malignant Mesothelioma. *Cancer*, 91: 1349-1357.
18. Kang S.K., Rabbani Z.N., Folz R.J., Golson M.L., Huang H., Yu D, Samulski T.S., Dewhirst M.W., Anscher M.S., Vujaskovic Z. 2003. Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects mice from radiation-induced lung injury. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 57: 1056-1066.
19. Kinnula V.L., Crapo J.D. 2003. Superoxide Dismutases in the Lung and Human Lung Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167: 1600-1619.
20. Kinnula V.L., Pääkkö P., Soini Y. 2004. Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *FEBS Letters*, 569: 1-6.
21. Lewin B. 1997. *Genes*. 6th edition. New York, Oxford University Press: 1260 str.

22. Li H., Kantoff P.W., Giovannucci E., Leitzmann M.F., Gaziano J.M., Stampfer M.J., Ma J. 2005. Manganese Superoxide Dismutase Polymorphism, Prediagnostic Antioxidant Status, and Risk of Clinical Significant Prostate Cancer. *Cancer research*, 65: 2498-2504.
23. Lin P., Hsueh Y., Ko J., Liang Y., Tsai K., Chen C. 2003. Analysis of NQO1, GSTP1, and MnSOD genetic polymorphisms on lung cancer risk in Taiwan. *Lung Cancer*, 40: 123-129.
24. Mac Manus-Spencer L.A., Edhlund B.L., McNeill K. 2006. Singlet oxygen production in the reaction of superoxide with organic peroxides. *The Journal of organic chemistry*, 71: 796-799.
25. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 1997. *Brock Biology of Microorganisms*. 8th edition. New Jersey, Prentice-Hall, Inc.: 986 str.
26. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1215.
27. Muñoz P., Sáez P., Iradi A., Viña J., Oliva M.R., Sáez G.T. 2001. Differences between cysteine and homocysteine in the induction of deoxyribose degradation and DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 30: 354-362.
28. Primic Žakelj M. 2006. *Incidenca raka v Sloveniji 2003*. Ljubljana, Onkološki inštitut, Register raka za Slovenijo: 80 str.
29. Quan F., Korneluk R.G., Tropak M.B., Gravel R.A. 1986. Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Research*, 14: 5321-5335.
30. Rahman I., Biswas S.K., Kode A. 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology*, 533: 222-239.



31. St. Clair D., Kasarskis E. 2003. Genetic polymorphism of the human manganese superoxide dismutase: what difference does it make? *Pharmacogenetics*, 13: 129-130.
32. Stare J. 1998. Relativno tveganje in razmerje obetov. *Zdravniški vestnik*, 67: 297-299.
33. Sutton A., Khoury H., Prip-Buus C., Capanec C., Pessayre D., Degoul F. 2003. The Ala<sup>16</sup>Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*, 13: 145-157.
34. Van Landeghem G.F., Tabatabaie P., Kučinskas V., Saha N., Beckman G. 1999. Ethnic Variation in the Mitochondrial Targeting Sequence Polymorphism of MnSOD. *Human Heredity*, 49: 190-193.
35. Van Remmen H., Ikeno Y., Hamilton M., Pahlavani M., Wolf N., Thorpe S.R., Alderson N.L., Baynes J.W., Epstein C.J., Huang T., Nelson J., Strong R., Richardson A. 2003. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiological genomics*, 16: 29-37.
36. Vollhardt K.P.C., Shore N.E. 2003 *Organic chemistry. Structure and Function*. 4th edition. New York, N.H. Freeman and company: 1203 str.
37. Wang L.I., Miller D.P., Sai Y., Liu G., Su L., Wain J.C., Lynch T.J., Christiani D.C. 2001. Manganese Superoxide Dismutase Alanine-to-Valine Polymorphism at Codon 16 and Lung Cancer Risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 93: 1818-1820.
38. Waris G., Ahsan H. 2006. Reactive Oxygen Species: Role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*, 5: 1-24.