

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRIS MAJCEN AUPIČ

**PRIMERJAVA GENETSKIH POLIMORFIZMOV GLUTATION S-
TRANSFERAZE M1 IN GLUTATION S- TRANSFERAZE T1 PRI BOLNIKIH
Z AZBESTOZO IN BOLNIKIH S PLEVRALNIMI PLAKI**

**COMPARISON OF GENETIC POLYMORPHISMS OF GLUTATHIONE S-
TRANSFERASE M1 AND GLUTATHIONE S-TRANSFERASE T1 IN
PATIENTS WITH ASBESTOSIS AND PATIENTS WITH PLEURAL
PLAQUES**

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študijski program Laboratorijska biomedicina

LJUBLJANA, 2017

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in v sodelovanju z Inštitutom za medicino dela prometa in športa v Ljubljani, pod so - mentorstvom izr. prof. dr. Alenke Franko.

Vsi podatki uporabljeni v magistrski nalogi so bili pridobljeni iz dokumentacije (na podlagi osebnega intervjuja izvedenega s strani raziskovalca, vključenega v projekt) v okviru projektov ARRS L3-9129 in P1-0170. V okviru istih projektov so bili odvzeti tudi vzorci krvi in pridobljeni rezultati genske analize.

ZAHVALA

Za vse nasvete in strokovno pomoč se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc in so - mentorici izr. prof. dr. Alenki Franko. Posebna zahvala gre tudi mojim sodelavcem, staršem, ter mojim najdražjim Dejanu, Ameli in Svitlu.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in so - mentorstvom izr. prof. dr. Alenke Franko.

Ljubljana, 2017

Iris Majcen Aupič

Komisija za zagovor:

Predsednik: izr. prof.dr. Matjaž Jeras, mag.farm.

Mentor: prof.dr. Marija Sollner Dolenc, mag.farm.

So-mentor: izr. prof. dr. Alenka Franko, dr.med.

Član: izr. prof.dr. Tomaž Vovk, mag.farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	4
KLJUČNE BESEDE	5
ABSTRACT	6
KEYWORDS	7
SEZNAM OKRAJŠAV	8
1 UVOD	10
1.1 AZBEST	10
1.2 TOKSIKOLOŠKI UČINKI AZBESTNIH VLAKEN	10
1.3 BOLEZNI ZARADI IZPOSTAVLJENOSTI AZBESTU	12
1.4 VLOGA REAKTIVNIH KISIKOVIH (ROS) IN DUŠIKOVIH (RNS) ZVRSTI PRI NASTANKU PULMONALNE TOKSIČNOSTI	17
1.5 GLUTATION S–TRANSFERAZE (GST)	20
1.5.1 Splošne in strukturne značilnosti.....	20
1.5.2 Ekspresija/prisotnost in distribucija glutacion S-transferaz (GST)	22
1.5.3 Polimorfizmi genskih zapisov za glutacion S-transferaze (GST).....	23
2 NAMEN DELA	25
3 MATERIALI IN METODE	26
3.1 PREISKOVANCI	26
3.2 GENSKE ANALIZE	26
3.2.1 Verižna reakcija polimerizacije (PCR) v realnem času.....	27
3.3 STATISTIČNE ANALIZE	28

3.3.1	Povprečna vrednost merjenega parametra.....	28
3.3.2	Mediana.....	28
3.3.3	Standardni odklon	29
3.3.4	χ^2 - test	29
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	31
4.1	RAZDELITEV PREISKOVANCEV PO OSEBNIH ZNAČILNOSTIH	31
4.1.1	Skupina s plevralnimi plaki (kontrolna skupina 1)	32
4.1.2	Skupina zdravih posameznikov (kontrolna skupina 2)	33
4.1.3	Primerjava med povprečno starostjo preiskovancev za vse tri skupine	34
4.1.4	Razdelitev preiskovancev znotraj posameznih skupin po spolu in kadilcih oz. nekadilcih glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTM1	35
4.1.5	Razdelitev preiskovancev znotraj posameznih skupin po spolu in kadilcih oz. nekadilcih glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTT1	37
4.2	STATISTIČNA ANALIZA – χ^2 – TEST	40
4.2.1	Primerjava med skupinami za rezultate genskega polimorfizma GSTM1.....	41
4.2.2	Primerjava med skupinami za rezultate genskega polimorfizma GSTT1	43
5	SKLEP.....	48
6	LITERATURA	50

POVZETEK

Ena najpogostejših bolezni, povezanih z izpostavljenostjo azbestu je azbestoza, ki vodi v povečano tveganje za razvoj pljučnega raka. Najpogostejša posledica izpostavljenosti azbestu pa je bolezen plevralnih plakov. Izpostavljenost azbestu in njegovi toksični učinki so povezani z nastajanjem reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti (ROS in RNS). Tako preko mehanizma nastanka ROS kot tudi preko aktivacije vnetnih celic, kot so alveolarni makrofagi in nevtrofilci, pride do usodnih poškodb DNA in s tem do bolezni, kot sta azbestoza in bolezen plevralnih plakov.

Glutation S-transferaze (GSTs) pripadajo II. fazi detoksifikacijskih encimov, za katere je značilno, da ne katalizirajo samo konjugacijo med glutationom in reaktivnimi elektrofilni, pač pa tudi konjugacijo z lipidnimi radikali ter igrajo pomembno vlogo pri nastajanju levkotrienskih vnetnih mediatorjev. GSTs delujejo tudi kot znotrajcelični prenašalni proteini za hem, bilirubin, žolčne pigmente, ščitnične hormone in steroide, poleg detoksifikacijske vloge pa imajo tudi regulatorno funkcijo. Zaradi prisotnosti genskih polimorfizmov GSTs pride navadno do zmanjšane encimske aktivnosti in zato nezadostne obrambe pred radikali, kar ima za posledico številne celične poškodbe.

Namen magistrske naloge je bil dokazati morebitne statistično pomembne razlike v prisotnosti genskega polimorfizma GSTM1 in/ali GSTT1, med skupinama bolnikov z azbestoza in bolnikov s plevralnimi plaki. S primerjavo rezultatov med skupinama smo želeli ugotoviti, ali prisotnost omenjenega genetskega polimorfizma predstavlja večji dejavnik tveganja za pojav azbestoze. Prikazali smo tudi primerjavo prisotnosti genskega polimorfizma GSTM1 in GSTT1 med skupinama bolnikov z azbestoza in zdravih posameznikov, ki so bili izpostavljeni azbestu, vendar niso zboleli.

Vse podatke, ki smo jih uporabili v magistrski nalogi (spol, starost, kajenje, vrsta bolezni, rezultati genskih analiz), smo pridobili iz dokumentacije (na podlagi osebnega intervjuja izvedenega s strani raziskovalca, vključenega v projekt) v okviru projektov ARRS L3-9129 in P1-0170.

Iz podatkov o starosti preiskovancev smo ugotovili, da je bila najstarejša populacija oseb v skupini z azbestozo (starost 63 let in standardni odklon 9,2 %), iz česar bi lahko sklepali, da je starost posameznika dodaten dejavnik tveganja za nastanek bolezni, hkrati pa bi bila lahko razlog za pogostejši nastanek azbestoze pri najstarejših tudi daljša latentna doba. Po razvrstitvi in analizi preiskovancev, glede na spol in kajenje, znotraj posameznih skupin, in sicer bolnikov z azbestozo, tistih s plevralnimi plaki in zdravih posameznikov, pa nismo ugotovili večjih odstopanj v prisotnosti oz. odsotnosti genskih polimorfizmov GSTM1 in GSTT1 med njimi.

Osrednji del naloge je predstavljalo proučevanje statistično značilnih razlik v genetskih polimorfizmih encimov glutation S-transferaze M1 in glutation S-transferaze T1 med skupinama bolnikov z azbestozo in bolnikov s plevralnimi plaki. Primerjavo genetskih polimorfizmov encimov GSTM1 in GSTT1 med skupinama obolelih za azbestozo in zdravih posameznikov pa smo v nalogo vključili zgolj informativno. Statistično pomembne razlike med omenjenimi skupinami smo ugotavljali s testom χ^2 . Ugotovili smo, da med skupinama bolnikov z azbestozo in tistih s plevralnimi plaki ni bilo statistično pomembnih razlik v prisotnosti genskega polimorfizma GSTM1 ($p = 0,183$) in genskega polimorfizma GSTT1 ($p = 0,252$). Enak rezultat smo dobili tudi pri primerjavi prisotnosti genskih polimorfizmov GSTM1 ($p = 0,615$) in GSTT1 ($p = 0,587$) med skupino ljudi z azbestozo in skupino zdravih posameznikov. Glede na omenjene rezultate, torej ne moremo trditi, da prisotnost genetskih polimorfizmov GSTM1 in GSTT1 vpliva na pojav azbestoze.

KLJUČNE BESEDE

Azbestoza, plevralni plaki, glutation S-transferaza M1, glutation S-transferaza T1

ABSTRACT

The most important toxic effect of asbestos is asbestosis, which leads to an increased risk of developing lung cancer and the most common result of exposure to asbestos is disease pleural plaques. Exposure to asbestos and its toxic effect is related to the generation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS). Thus, through the mechanism of the formation of ROS as well as activation of inflammatory cells such as alveolar macrophages and neutrophils, results in fatal damage of the DNA and diseases such as asbestosis and disease pleural plaques.

Glutathione S-transferases (GSTs) belong to phase II. detoxification enzymes, which are known not to only catalyse the conjugation of glutathione and reactive electrophiles, but also catalyse the conjugation with lipid radicals and play an important role in the generation of leukotriene inflammatory mediators. GSTs also act as an intracellular transfer protein for the hem, bilirubin, bile pigment, thyroid hormones and steroids and in addition to the detoxification role they also have a regulatory function. Due to the presence of genetic polymorphisms of GSTs reduced enzyme activity occurs and consequently inadequate defences against radicals, which results in a numerous cellular damage.

The purpose of the master's thesis was to demonstrate statistically significant differences in the presence of a genetic polymorphism of GSTM1 and / or GSTT1 among a group of patients with asbestosis and a group of patients with pleural plaques. By comparison of the results between the two groups we tried to determine whether the presence of mentioned genetic polymorphism GSTM1 and / or GSTT1 represents a risk factor for asbestosis. In this work a comparison of the presence of a genetic polymorphism of GSTM1 and GSTT1 among a group of patients with asbestosis and a group of healthy individuals who have been exposed to asbestos but are not ill was also shown.

All the data that was used in the master's thesis (gender, age, smoking, type of disease, the result of genetic analysis) were obtained from the documentation (on the basis of a personal interview performed by a researcher involved in the project) within the scope of projects ARRS L3-9129 and P1-0170.

From the data on the age of the subjects it was found that the oldest population of people was in the group with asbestosis (age 63 and a standard deviation of 9.2%), from which it could be concluded that the age of the individual is additional risk factor for diseases such as asbestosis and at the same time the reason for the occurrence of asbestosis in the group with the highest age could be consequent long latent period. The analysis and classification of subjects by sex and smoking within groups of patients with asbestosis, patients with pleural plaques and the group of healthy individuals did not reveal significant variations in the presence or the absence of genetic polymorphisms GSTM1 and GSTT1 between groups as a percentage.

The focus of this research project was to study statistically significant differences in the genetic polymorphism of enzymes glutathione S-transferase M1 and glutathione S-transferase T1 between the group of patients with asbestosis and a group of patients with pleural plaques. Comparison of the genetic polymorphism of enzymes GSTM1 and GSTT1 among the group of those suffering from asbestosis and a group of healthy individuals were included in the research informatively. We tried to prove statistically significant differences between these groups with the χ^2 test. The results showed that there were no statistically significant differences in the presence of a genetic polymorphism GSTM1 (p - value of 0.183) and the presence of a genetic polymorphism GSTT1 (p - value of 0.252) between the group of people with asbestosis and the group of people with pleural plaques. There was also no statistically significant differences in the presence of a genetic polymorphism GSTM1 (p - value of 0.615) and the presence of a genetic polymorphism GSTT1 (p - value of 0.587) between the group of people with asbestosis, and the group of healthy individuals. Due to these results, we were unable to confirm, that the presence of the genetic polymorphism of GSTM1 and GSTT1 affects the occurrence of asbestosis, so consequently cannot confirm the genetic impact of mentioned polymorphisms on the occurrence of diseases such as asbestosis.

KEYWORDS

Asbestosis, pleural plaques, glutathione S-transferase M1, glutathione S-transferase T1

SEZNAM OKRAJŠAV

AP-1	Aktivirani protein – 1
APex/Ref 1	AP-endonukleazni / redoks popravljalni dejavnik oz. encim (angl. Apurinic/Apyrimidic DNA-repair endonuclease / redox repair factor 1 protein)
CAT	Katalaza (angl. Catalase)
Cu/Zn – SOD	Baker/cink superoksidna dismutaza
DNA	Deoksiribonukleinska kislina (ang. Deoxyribonucleic acid)
FAK	Fokalna adhezinska kinaza
Fe³⁺	Železovi 3 ⁺ ioni
Fe²⁺	Železovi 2 ⁺ ioni
GPx	Glutationska peroksidaza
GSH	Glutation
GST	Glutation S-transferaza
GSTM1	Glutation S-transferaza M1 (M = mu)
GSTT1	Glutation S-transferaza T1 (T = theta)
GSTP1	Glutation S-transferaza P1 (P = pi)
GSTA1	Glutation S-transferaza A1 (A = alfa)
H₂O₂	Vodikov peroksid
H₂O	Voda
HO·	Hidroksilni radikal
IGF-1	Inzulinu podobni rastni dejavnik (angl. Insulin-like growth factor 1)
IL-1	Interleukin - 1
IL-6	Interleukin - 6
IL-8	Interleukin - 8
iNOS	Inducibilna sintaza dušikovega oksida
JNK	Terminalna kinaza c-jun N
MAPK	Mitogeno aktivirana proteinska kinaza
MMP-1	Matriksna metaloproteinaza
Mn-SOD	Mangan – suproksidna dismutaza
NFκB	Nuklearni faktor kappa B

NO	Dušikov oksid
O₂^{-•}	Superoksidni anion
O₂	Kisik
ONOO⁻	Peroksinitritni anion
PCR	Verižna reakcija s polimerazo DNA (ang. Polymearse chain reaction)
PDGF	Trombocitni rastni dejavnik (angl. Platelet-Derived Growth Factor)
PKC	Proteinska kinaza C
RNA	Ribonukleinska kislina (ang. Ribonucleic acid)
RNS	Reaktivne dušikove zvrsti (angl. Reactive nitrogen species)
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti (angl. Reactive oxygen species)
SOD	Superoksidna dismutaza
TK	Tirozinska kinaza
TGFα	Tranformirajoči rastni dejavnik α (angl. Transforming growth factor α)
TGFβ	Tranformirajoči rastni dejavnik β (angl. Transforming growth factor β)
TNFα	Tumorje nekrozirajoči dejavnik α (angl. Tumor necrosis factor α)

1 UVOD

1.1 AZBEST

Beseda azbest izhaja iz grške besede »asbestos«, ki pomeni neuničljiv, kar pove veliko o njegovih kemijsko fizikalnih lastnostih (1). Azbest je ime za skupino naravnih silikatnih mineralov, ki jih v naravi najdemo v zemlji in kamninah (1,2). Glede na obliko vlaken, ki jih vsebujejo, jih razdelimo v dve glavni skupini in sicer serpentine, katerih edini predstavnik je krizotil, in amfibole. Krizotil ali beli azbest, je najpogostejša oblika azbesta, uporabna v industriji. Pod mikroskopom ima obliko belih votlih elastičnih spiral, ki jim rečemo serpentine. Druga skupina so amfiboli, ki vsebujejo ravna vlakna v obliki majhnih iglic. Poznamo več podtipov amfibolnih vlaken, in sicer amozit (rjavi azbest), krokidolit (moder azbest), tremolit, aktinolit in antofilit. Obe vrsti azbesta, tako krizotil kot amfiboli, so za človeka toksični (2).

Čeprav so azbestna vlakna v naravi mikroskopskih velikosti, pa so izredno trpežna in odporna na vročino, ogenj ter električne in kemijske poškodbe. Te lastnosti azbesta so bile glavni razlog za njegovo množično uporabo v gradbeništvu (izolacijski material, strešna kritina), v avtomobilski in tekstilni industriji (2).

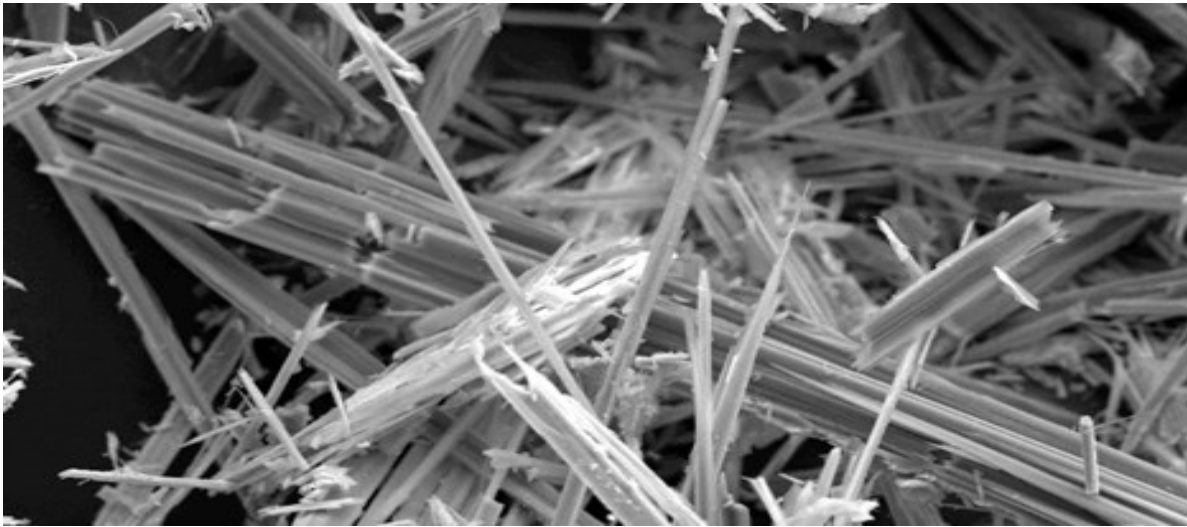
Izpostavljenost azbestu poteka najpogosteje na dva načina, in sicer bodisi preko vdihovanja azbestnih vlaken, kar je najpogostejši način vnosa v telo, ali pa njihovega zaužitja z onesnaženo hrano in vodo (2). Najbolj problematična od vseh je poklicna izpostavljenost azbestu, ki se je pojavljala v azbestno-cementni in avtomobilski industriji, v proizvodnji izolacijskih materialov ter izpostavljenost prebivalstva v bližini tovarn, kjer so je azbest predelovali ali ga kako drugače uporabljali (3).

Uporaba azbesta je začela strmo upadati v poznih 70-ih letih, ko je postalo očitno, da predstavlja grožnjo za zdravje in varnost ljudi (2).

1.2 TOKSIKOLOŠKI UČINKI AZBESTNIH VLAKEN

Azbest ima genotoksične lastnosti in lahko povzroči poškodbe DNA, transkripcijo genov in izražanje proteinov, pomembnih za proliferacijo celic, celično smrt in vnetje (4). Zaradi vseh znanih toksičnih lastnosti azbesta, ta, po klasifikaciji Mednarodne agencije za raziskave raka

(IARC, angl. International agency for research of cancer) spada v skupino 1, in je torej klasificiran kot znani človeški karcinogen (5)



Slika 1: Azbestna vlakna pod mikroskopom (4).

Toksični učinki azbestnih vlaken so odvisni od številnih dejavnikov, predvsem trajanja izpostavljenosti od časa prve izpostavljenosti in kajenja. Dokazano je namreč, da imajo kadilci, ki so bili izpostavljeni azbestnim vlaknom večjo verjetnost, da zbolijo za rakom pljuč. Pomemben dejavnik v toksičnosti azbesta so tudi fizikalne lastnosti azbestnih vlaken, npr. vrsta in velikost. Večino študij in raziskav o škodljivih vplivih azbesta na zdravje ljudi so opravili na populaciji ljudi, ki so bili v preteklosti izpostavljeni azbestnim vlaknom daljšim od $5,0 \mu\text{m}$, in sicer na delovnih mestih, kjer so bile njihove koncentracije v zraku približno $5.000.000 /\text{m}^3$ (5 vlaken/mL) (5).

Številne študije potrjujejo, da so amfibolna vlakna (tremolit, amozit in predvsem krokidolit) bolj škodljiva kot krizotilna, velikost azbestnih vlaken (dolžina in premer) pa igra pomembno vlogo pri tveganju za nastanek določenih rakavih obolenj. Vlakna daljša od $5,0 \mu\text{m}$ so bolj toksična od tistih, ki so krajša od $2,5 \mu\text{m}$, medtem ko so vlakna debelejša od $3,0 \mu\text{m}$ manj nevarna, saj ne morejo prodreti v globlje strukture pljuč (5).

Zaradi omenjenih toksičnih učinkov so mednarodne agencije za zdravje izdale priporočila glede izpostavljenosti azbestu. Agencija za zaščito okolja (ZDA) (EPA; angl. Environmental Protection Agency) je predlagala, da naj bo najvišja dovoljena koncentracije azbestnih vlaken v pitni vodi 7 milijonov/L (za vlakna daljša od $5 \mu\text{m}$), medtem ko ameriška agencija za hrano in zdravila (ZDA) (FDA; angl. Food and Drug Administration) predpisuje in kontrolira

izdelavo zdravil in ovojnin za hrano brez uporabe azbesta. Nacionalni inštitut za varnost in zdravje pri delu (ZDA), (NIOSH; angl. The national Institute for Occupational safety and health) je izdal predpis, da koncentracija azbestnih vlaken v zraku ne sme preseči 100.000 vlaken daljših ali enakih $5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ oz. 0,1 vlakna/mL. Mednarodna agencija za varnost in zdravje pri delu (ZDA) (OSHA; angl. Occupational Safety and Health Administration) je določila največje dopustne koncentracije azbestnih vlaken na delovnem mestu. Največja dopustna koncentracija azbestnih vlaken na delovnem mestu v roku 8 urnega delovnika je 100.000 vlaken daljših ali enakih $5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ oz. 0,1 vlakna/mL (5). Vendar pa moramo te mejne vrednosti jemati z veliko mero previdnosti, saj se škodljivi učinki pri nekaterih izpostavljenih lahko pojavijo že pri nižjih koncentracijah.

1.3 BOLEZNI ZARADI IZPOSTAVLJENOSTI AZBESTU

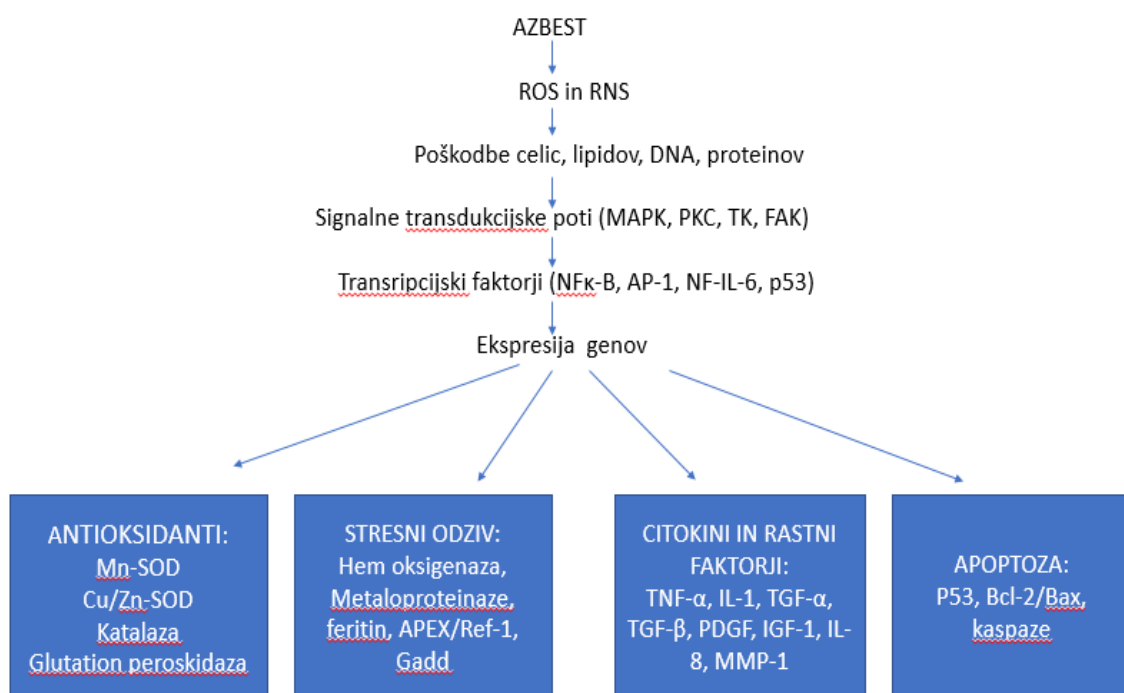
Bolezni, ki so posledica izpostavljenosti azbestu, moramo obravnavati izredno previdno predvsem zaradi dolge latentne dobe. Od izpostavljenosti azbestnim vlaknom do pojava posamezne bolezni lahko mine od 30 - 40 let oziroma zlasti za maligna obolenja celo 60 let in več. To zahteva dolgotrajno obravnavo ljudi, ki so bili azbestu izpostavljeni tako poklicno kot nepoklicno (1).

Izpostavljenost azbestu ima lahko za posledico vrsto benignih in malignih obolenj. Med najpogostejše benigne bolezni prištevamo azbestozo in bolezni plevre, kot so plevralni plaki, difuzne zadebelitve plevre in plevralni izliv, med maligne bolezni pa pljučni rak in maligni mezoteliom ter druge vrste raka, kot je rak grla, žrela, jajčnikov, prebavil itd. (1,3,6).

Patogeneza bolezni povzročenih zaradi izpostavljenosti azbestnim vlaknom je povezana z vztrajajočim vnetnim odzivom preko neposrednega ali posrednega mehanizma tvorbe ROS, hkrati pa je patogeneza bolezni povezana tudi s tvorbo citokinov, kemokinov, rastnih faktorjev in pro-vnetnih faktorjev. Hipotetični prikaz dogodkov celičnega signaliziranja in vnetnih sprememb, ki posledično privedejo do bolezni, ki so povezane z izpostavljenostjo azbestu, je prikazan na Sliki 2 (7).

Ko azbestno vlakno vdihnemo, ta pride v alveolarni prostor v pljučih, kjer reagira z ekstracelularnim matriksom. Tam jih prevzamejo alveolarni makrofagi, ki na tak način poskušajo očistiti pljuča azbestnih delcev. Glede na fizikalne lastnosti azbestnih vlaken (vrsta, dolžina in premer vlakna) je tak prevzem bodisi uspešen, lahko pa tudi neuspešen. V kasnejši fazi pride do aktivacije makrofagov na celični in molekularni ravni z aktivacijo transkripcijskih

faktorjev, ki povečajo sproščanje ROS, RNS, kemotaktičnih faktorjev, litičnih encimov, citokinov in rastnih faktorjev z morebitnim posledičnim nastankom nekroze in/ali apoptoze. Vlakna, ki jih alveolarni makrofagi zaradi neugodnih fizikalnih lastnosti ne zmorejo odstraniti, so razlog nenehnega nastajanja novih alveolarnih makrofagov, nevtrofilcev in limfocitov, kar privede do konstantnega vnetnega odziva. Tarčne celice v pljučih, kot so bronhialne in alveolarne epitelijske celice, so poškodovane tako zaradi delovanja omenjenih vnetnih celic, kot tudi zaradi prisotnosti azbestnih vlaken v pljučih, čemur zopet lahko sledi celična smrt (8).

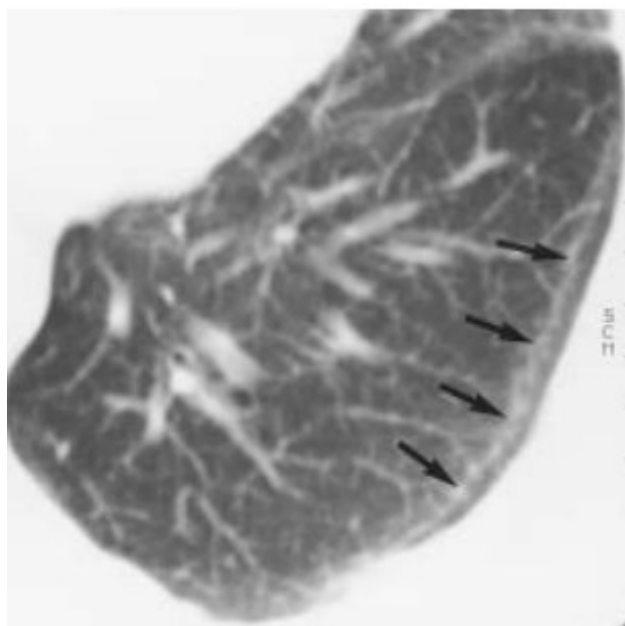


Slika 2: Predlagani mehanizem pulmonalne toksičnosti zaradi izpostavljenosti azbestu (4).

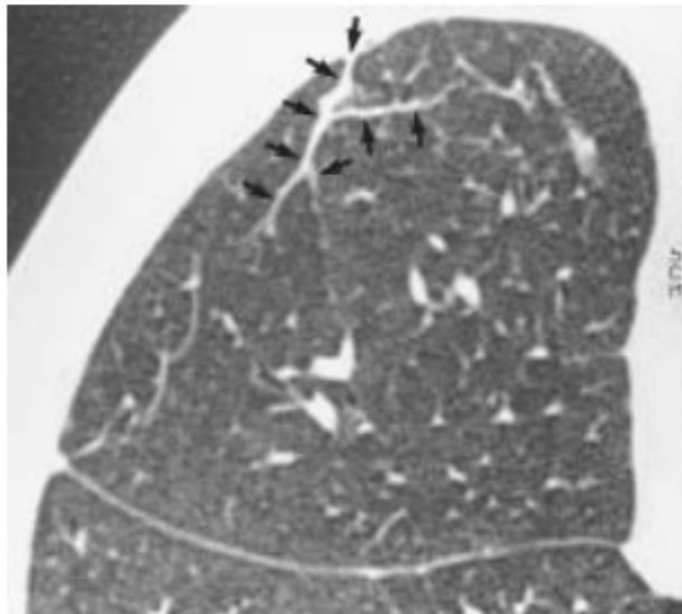
Nekateri izmed pomembnih citokinov in rastnih faktorjev, ki so vključeni v patogenezo bolezni povezanih z azbestom, so, IL-1, TNF- α , TGF- β , PDGF in IL-8. Delujejo tako, da povečajo obseg celičnih poškodb, aktivirajo proliferacijo fibroblastov ter odlaganje kolagena. Kljub temu, da naj bi bili alveolarni makrofagi primarni vir omenjenih proteinov, pa so pri nastanku teh proteinov vključene tudi pulmonalne epitelijske celice. Zadnje raziskave kažejo, da citokin TNF- α igra ključno vlogo pri patogenezi bolezni, ki so posledica izpostavljenosti azbestu. Povečane koncentracije omenjenega citokina so raziskovalci potrdili pri bolnikih z azbestozo in bolnikih z idiopatično pljučno fibrozo v alveolarnih makrofagih in v pulmonalnih hiperplastičnih epiteljskih celicah tipa II (4).

Kompleksne signalne poti, ki so predstavljene na sliki 2, so verjetno soodvisne v odzivu na azbest in naj bi imele različne vloge v različnih celicah in v različnih fazah celičnega cikla (7).

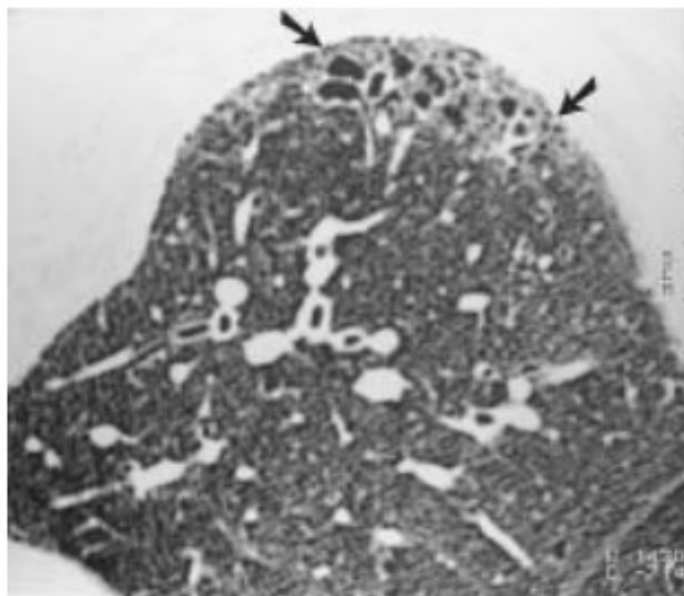
1.3.1 Azbestoza je kronična pljučna bolezen, ki je posledica dolgotrajnega vnetnega odziva zaradi prisotnosti azbestnih vlaken v pljučih, kar privede do razvoja pljučne fibroze in izgube pljučne funkcije. Znaki azbestoze so bili opaženi pri skupini delavcev, ki so bili kronično izpostavljeni azbestu v koncentracijskem območju od 32-1271 vlaken/leto/mL zraka (5). Klinični znaki azbestoze se pojavijo približno 10 – 40 let po izpostavljenosti azbestu in obsegajo: težko dihanje, persistenten in suh kašelj, izgubo apetita s posledično izgubo teže, bolečine in stiskanje v prsih, zaobljene in širše konice prstov na rokah in nogah. Diagnostika boleznj zajema klinični pregled, rentgensko slikanje, teste za oceno pljučne funkcije, pogosto pa tudi biopsijo pljučnega tkiva. Bolezen se uspešno obvladuje s terapijami s kisikom, ki blaži težko sapo in z zdravili ki redčijo sekret, ter blažijo bolečine v pljučih. Azbestoza je dejavnik tveganja za razvoj pljučnega raka. Ko bolezen enkrat napreduje v pljučnega raka, je prognoza boleznj slaba, saj je verjetnost 5 letnega preživetja 25 %. Pri nastanku azbestoze igrajo pomembno vlogo tudi genetski dejavniki, o katerih pa je znano relativno malo (3,9). Spremembe pljuč posnetih z računalniško tomografijo, značilne za azbestozo, so prikazane na slikah 3 -5 (6).



Slika 3: Spremembe pljučnega tkiva - subplevralne linije in zgostitve (6).



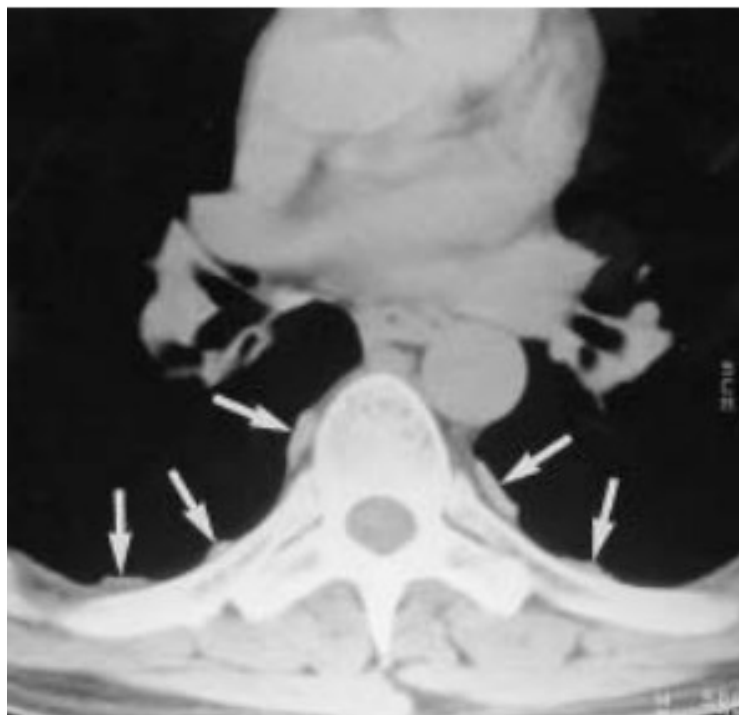
Slika 4: Spremembe pljučnega tkiva – parenhimski trački (6).



Slika 5: Spremembe pljučnega tkiva – zgostitve z videzom motnega stekla (6).

1.3.2 Plevralni plaki so bolezen, ki se pojavi izključno zaradi izpostavljenosti azbestu in se kaže kot zadebelitve plevre. Je najpogostejša bolezen, ki se pojavi zaradi

izpostavljenosti azbestnim vlaknom. Pojavi se od 20 - 40 let po izpostavljenosti (6). Povečana pojavnost bolezni je bila opažena že pri relativno nizkih koncentracijah izpostavljenosti (približno 0,12 vlaken/leto/mL zraka). S časom lahko pride do kalcifikacij v pljučih, kar privede do zmanjšane pljučne funkcije, vendar sama bolezen ne napreduje v maligno obliko pljučne bolezni (rak pljuč). Ker so rezultati rentgenskega slikanja pogosto nezanesljivi, se pri diagnozi bolezni poslužujejo tudi računalniške tomografije. V literaturi so omenjeni tudi hujši primeri bolezni plevralnih plakov, ki naj bi bili posledica izpostavljenosti visokim koncentracijam azbestnih vlaken (5). Večina bolnikov nima kliničnih znakov bolezni, nekateri pa poročajo o bolečinah v prsih in neprijetnih občutkih med dihanjem. Bolnike, ki imajo težave, zdravijo simptomatsko (6,10).



Slika 6: Posnetek pljuč z računalniško tomografijo. S puščicami so označene goste pleuralne linearne strukture - plevralni plaki. (6).

1.3.3 Plevralni izliv pomeni kopičenje odvečne tekočine v prsni votlini in povzroči oteženo dihanje. Pogosto je spremljevalni pojav pri boleznih, ki nastanejo kot posledica izpostavljenosti azbestnim vlaknom. Ločimo benigni in maligni plevralni izliv. Najpogostejši vzrok benignega plevralnega izliva so vnetje plevre, pljučnice, pljučni

abscesi itd., najpogostejši vzrok malignega plevralnega izliva pa je pljučni rak. Benigni plevralni izliv ni življenjsko nevaren, medtem ko je maligni plevralni izliv, ki pogosto nastane kot posledica malignega mezotelioma in pljučnega raka, življenjsko ogrožajoče stanje (11).

1.3.4 Pljučni rak je ena najhujših bolezní kot posledica izpostavljenosti azbestu. Dejavniki tveganja so številčni, najbolj pomembni pa so trajanje izpostavljenosti azbestu in koncentracije azbestnih vlaken, čas prve izpostavljenosti, starost ob prvi izpostavljenosti in trajanje izpostavljenosti, kajenje ter vrsta in velikost azbestnih vlaken, katerim je bil bolnik izpostavljen (5). Zgodnji simptomi bolezní so oteženo dihanje, kašelj, izkašljevanje krvi, izguba apetita, utrujenost in infekcijske bolezní, kot so pljučnica in bronhitis. Znaki že napredovane bolezní so bolečine v kosteh, otekanje obraza, ramen in vratu, glavoboli, omedlevica, zlatenica itd. Prognoza bolezní je slaba, saj je bolezen velikokrat odkrita že v napredovani fazi (12).

1.3.5 Maligni mezoteliom je zelo agresivno maligno obolenje. Več kot 70 % vseh malignih mezoteliomov je plevralnih. Gre za maligno obolenje mehkega tkiva, ki obdaja pljuča in ga imenujemo plevra. V skoraj vseh primerih plevralnega mezotelioma gre za posledico izpostavljenosti azbestu. Bolezen se pojavi od 20 - 60 in več let po izpostavljenosti. Prvi simptomi so težko dihanje in bolečine v prséh, suh kašelj, izkašljevanje krvi, težave pri požiranju. Pričakovana življenjska doba je manj kot 18 mesecev (13).

1.4 VLOGA REAKTIVNIH KISIKOVIH (ROS) IN DUŠIKOVIH (RNS) ZVRSTI PRI NASTANKU PULMONALNE TOKSIČNOSTI

Raziskave potrjujejo, da imajo prosti radikali pomembno vlogo pri boleznih ki nastanejo kot posledica izpostavljenosti azbestu. Vodikov peroksid (H_2O_2), superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (HO^{\bullet}) in nekatere reaktivne dušikove zvrsti (RNS) so dokazano pomembni mediatorji toksičnosti azbesta. Azbest povzroča nastanek reaktivnih zvrsti preko dveh osnovnih mehanizmov (4).

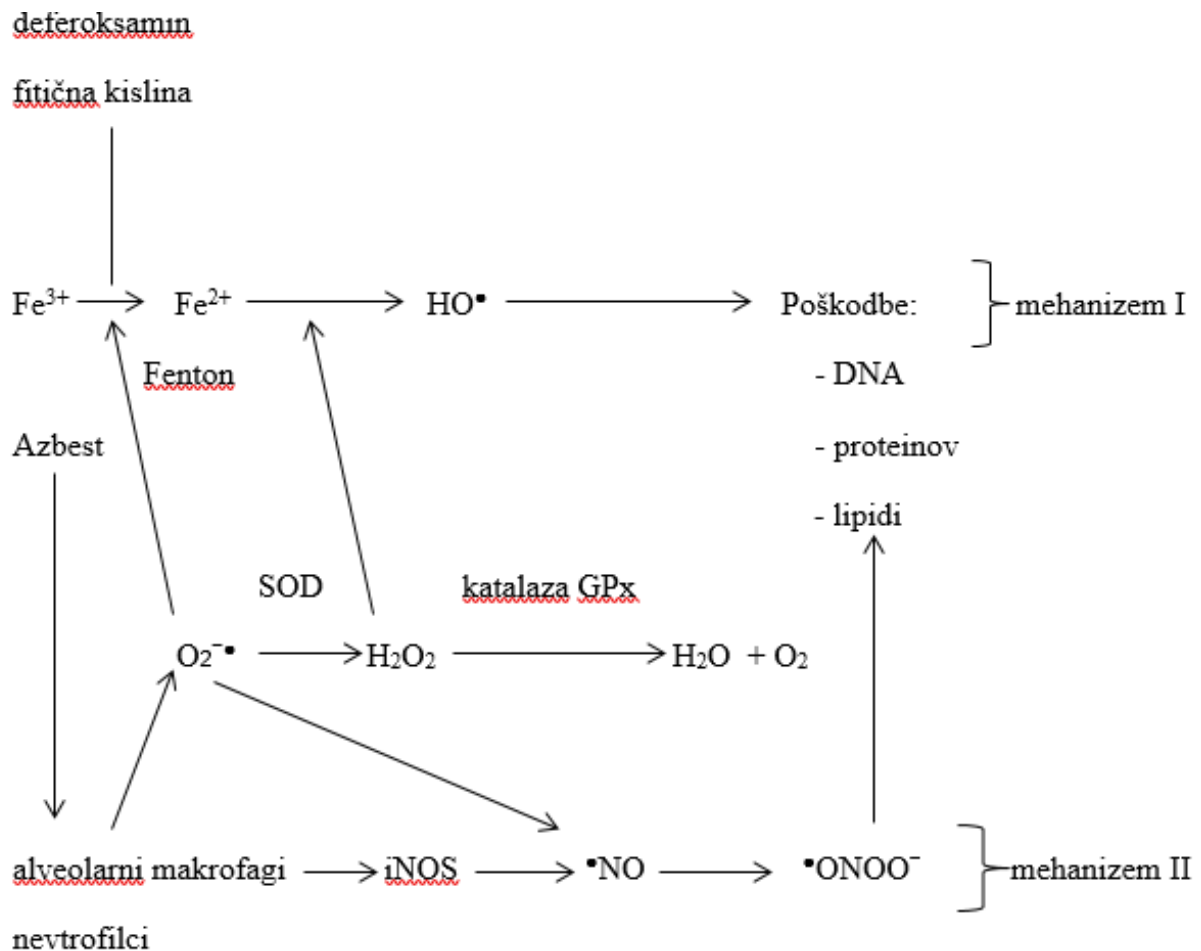
Pri prvem mehanizmu (direktni) gre za tvorbo hidroksilnega radikala ($\text{HO}\cdot$) v reakciji, ki jo katalizirajo železovi ioni v azbestnem vlaknu. Kemijska struktura samega azbestnega vlakna lahko namreč povzroči nastanjanje ROS v celičnih sistemih. Vse vrste azbesta imajo v svoji kristalinični strukturi osrednji element, ki je železov kation. Azbestno vlakno v kombinaciji z železom v Fentonovi reakciji povzroči tvorbo visoko reaktivnega $\text{HO}\cdot$ iz H_2O_2 , medtem ko lahko $\text{O}_2^{\cdot-}$, ki v celicah nastaja neprenehoma tudi med celičnim dihanjem, z H_2O_2 vstopa v Haber-Weissovo reakcijo, pri čemer zopet nastane $\text{HO}\cdot$, hkrati pa se Fe^{3+} reducira nazaj v redoks aktivno obliko Fe^{2+} . Železo v azbestu lahko povzroči tudi nastanek visoko reaktivnega ferila (FeO^{2+}). Hkrati so študije pokazale, da je lahko železov kation v azbestu podvržen večkratnim in ponavljajočim se oksidacijam in redukcijam, pri čemer znova in znova nastajajo škodljive radikalske zvrsti (4).

Pri drugem mehanizmu (indirektni) gre za nastanek reaktivnih zvrsti ob aktivaciji vnetnih celic med samo fagocitozo azbestnih vlaken. Azbest namreč stimulira tvorbo $\text{O}_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 v alveolarnih makrofagih in nevtrofilcih in pospeši oksidativni izbruh in lipidno peroksidacijo v pljučnih epiteljskih celicah in fibroblastih, ki so zadolženi za fagocitiranje azbestnih vlaken. Eksogene vrste ROS, ki so posledica cigaretnega dima in vplivov ozona, pa lahko dokazano še pospešijo privzem azbesta v celicah. Dejstvo je, da alveolarni makrofagi in nevtrofilci igrajo pomembno vlogo pri patogenezi pljučnih bolezni, ki so posledica izpostavljenosti azbestnim vlaknom. Alveolarni makrofagi namreč ščitijo pljuča tako, da poskušajo omejiti obremenitev pljuč z azbestom. Azbestna vlakna lahko tudi direktno aktivirajo encimske sisteme, ki proizvajajo ROS, kot sta NADPH oksidaza in fosfolipaza C (4). Oba mehanizma (direktni in indirektni mehanizem) sta shematsko prikazana na sliki 7.

Nedavne raziskave dokazujejo, da lahko azbest povzroči nastanek reaktivnih dušikovih zvrsti, kot so dušikov oksid (NO) in peroksinitritni anion (ONOO^-). Do povečanega nastajanja NO pride, ker azbest povzroči ekspresijo in povečano aktivnost encima inducibilne sintaze NO v alveolarnih makrofagih, medtem ko visoko reaktivni oksidant ONOO^- , ki lahko poškoduje celo vrsto bioloških molekul, nastaja pri reakciji med NO in $\text{O}_2^{\cdot-}$. Zanimivo je dejstvo, da ne glede na to, da iz NO nastajajo visoko reaktivne škodljive spojine, ima le ta tudi antioksidativno vlogo, saj zavira lipidno peroksidacijo, ki jo sproži prisotnost H_2O_2 (4).

Reaktivne kisikove zvrsti, zlasti HO in reaktivne dušikove zvrsti, zlasti ONOO^- , lahko spremenijo biološke makromolekule, kot so proteini, celični membranski lipidi, DNA in

RNA, kar ima za posledico celično disfunkcijo, citotoksičnost in maligno transformacijo celic (4).



Slika 7: Shematski prikaz mehanizma nastanka radikalov pod vplivom azbesta preko direktnega (mehanizem I) in indirektnega (mehanizem II) mehanizma (4).

S spinsko magnetno resonanco je bilo ugotovljeno, da različne vrste azbesta, kot so krizotil, amozit in krokodolit povzročajo nastanek HO^\bullet ob prisotnosti H_2O_2 . Pomembna ugotovitev je tudi, da deferoksamin in fityčna kislina, ki imata vlogo kelatorja železovih ionov, lahko zavreta nastanek HO^\bullet . Zaščitna vloga takšnih kelatorjev tekom časa v bioloških sistemih upada zaradi naravnega ravnovesja med kelatorji in železovimi ioni oziroma zaradi zmanjšanja same količine kelatorja (4).

Ob tvorbi (ROS) v telesu pride do aktivacije številnih antioksidativnih sistemov. Številni specifični encimi sodelujejo pri odstranitvi ROS in RNS, med njimi superoksidna dismutaza (SOD), katalaza (CAT) in glutathion peroksidaza (GPx). SOD katalizira dismutacijo $O_2^{\bullet-}$ v H_2O_2 in kisik, nato pa katalaza (CAT) katalizira pretvorbo vodikovega peroksida H_2O_2 v vodo in kisik. Drugi pomemben encim vključen v odstranjevanje ROS in RNS je glutathion S-transferaza, ki katalizira konjugacijo reduciranega glutathiona z različnimi elektrofilnimi spojinami, kot so ksenobiotiki, zdravilne učinkovine itd. (14).

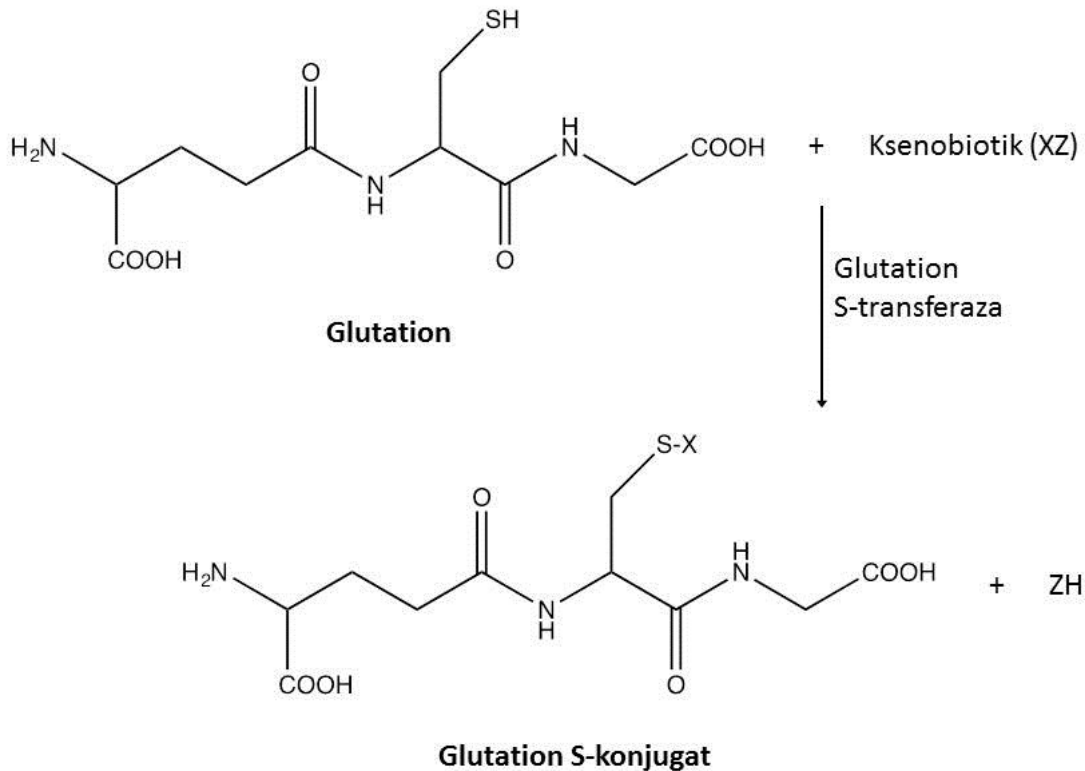
1.5 GLUTATHION S-TRANSFERAZE (GST)

1.5.1 Splošne in strukturne značilnosti

Glutathion S-transferaze (GST) pripadajo fazi II detoksifikacijskih encimov. Imajo več pomembnih funkcij v celicah, kot so odstranjevanje reaktivnih kisikovih zvrsti, regeneracija S-tiolnih proteinov in detoksifikacija ksenobiotikov (15, 16). Hkrati igrajo pomembno vlogo v reakcijah konjugacije, saj katalizirajo konjugacijo glutathiona (GSH) s širokim izborom različnih spojin, kar ima za posledico tvorbo konjugatov. Skoraj vedno je nastali konjugat manj reaktiven in tako manj nevaren, le v redkih primerih se lahko zgodi, da je nastali produkt še bolj reaktiven kot izhodna spojina (16). Spojine, ki jih metabolizirajo encimi glutathion S-transferaze, vključujejo številne ksenobiotike, med drugim tudi zdravilne učinkovine oz. njihove metabolite, nastale v fazi I metabolnih reakcij (npr. paracetamol, adriamicin), topila (kloroform, organski nitrati), toksine (aflatoksin), insekticide (DDT) in številne druge. Velika količina teh ksenobiotikov zmanjša količine GSH v jetih ter tako oslabi antioksidativno obrambno zmogljivost jeter (17). GST naj bi imele ključno vlogo tudi pri odgovoru organizma na stres, ki ga povzroči izpostavljenost azbestnim vlaknom. GST z normalno encimsko aktivnostjo, naj bi namreč sodelovale pri detoksifikaciji azbestnih vlaken v organizmu. V primeru odsotnosti encimske aktivnosti GST, do takšne detoksifikacije ne more priti, kar lahko privede do apoptoze celic in posledično bolezni, ki so značilne za izpostavljenost azbestu (16). Več o različnih polimorfizmih GST in posledični odsotnosti encimske aktivnosti v povezavi z izpostavljenostjo azbestu smo opisali v poglavju Polimorfizmi genskih zapisov za GST v nadaljevanju naloge.

Za mnoge glutathion S-transferaze domnevajo, da poleg katalitično/detoksifikacijske funkcije služijo tudi kot znotrajcelični prenašalni proteini za hem, bilirubin, žolčne pigmente, ščitnične hormone in steroide (17). Poleg detoksifikacijske vloge imajo glutathion S-transferaze tudi

regulatorno funkcijo in sicer tako, da z reguliranjem signalne poti ščitijo celice pred apoptozo, ki je posledica delovanja ROS. Glutation S-transferaza namreč reagira z c-jun N – terminalno kinazo (JNK), ki je vključena pri odzivu na stres, jo s tem inhibira in tako preprečuje poškodbe celic oz. apoptozo.(18).



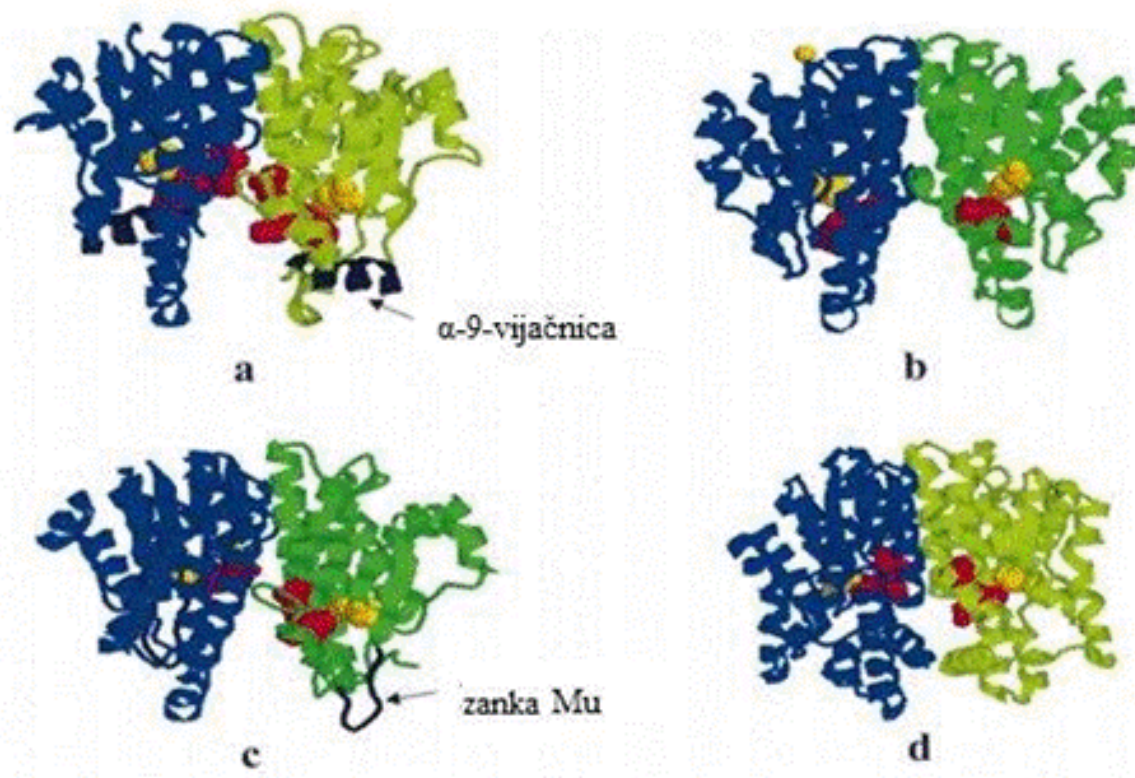
Slika 8: Reakcija konjugacije glutationa (GSH) in nastanek konjugata (19).

Glutation S-transferaze pri človeku razdelimo v tri glavne skupine:

1. citosolne glutation S-transferaze,
2. mitohondrijske glutation S-transferaze in
3. mikrosomalne glutation S-transferaze vezane na membranske proteine (18).

Vse tri skupine so si med seboj strukturno različne, njihova funkcija pa je podobna. Vse skupine so namreč sposobne katalizirati konjugacijo glutationa z različnimi elektrofilnimi spojinami. Najbolj pomembna in raziskana je skupina citosolnih glutation S-transferaz, ki jo pri človeku razdelimo na več podtipov oziroma več izoencimov in sicer alfa (A), mu (M), pi (P), sigma (S), theta (T), zeta (Z) in omega (O) (16,18). Struktura funkcionalne glutation S-transferaze obstaja v obliki dimera, bodisi v obliki identičnih (homodimernih) ali različnih

(heterodimernih) podenot. Vsaka podenota encima ima dve funkcionalni regiji in sicer hidrofilno, kamor se veže glutation, ter hidrofobno, kamor se vežejo strukturno različni elektrofilni substrati (18).



Slika 9: Strukture glutation S-transferaze pri človeku: (a) alfa; (b) pi; (c) mu; (d) theta (15).

1.5.2 Ekspresija/prisotnost in distribucija glutation S-transferaz (GST)

Izražanje družine encimov glutation S-transferaz je precej kompleksno, saj je distribucija omenjene družine encimov odvisna od spola, starosti in vrste (distribucija GST se razlikuje pri človeku in živalih). Razlike pri izražanju so pomembne tudi med izražanjem pri fetusu ali človeku v odrasli dobi. GSTA1, GSTA2 in GSTM1 so encimi, ki se v visokih koncentracijah izražajo enako tekom celega življenja. Regulacija izražanja se razlikuje glede na tip tkiva oz. tip celic, v katerih se določena vrsta glutation S-transferaz nahaja; npr. GSTA1 je najbolj prisotna v jetrih, ledvicah in testisih, medtem ko je GSTP1 v najvišjih koncentracijah prisotna v možganih, pljučih, ne pa tudi v jetrih. GSTM2 se v relativno visokih koncentracijah pojavlja v možganih, medtem ko je GSTM1 prisotna predvsem v jetrih. GSTT1 se prednostno izraža v

ledvicah in jetrih, medtem ko se v drugih organih izraža v zelo nizkih koncentracijah. Celo v istem organu se lahko koncentracije razlikujejo od tkiva do tkiva (18).

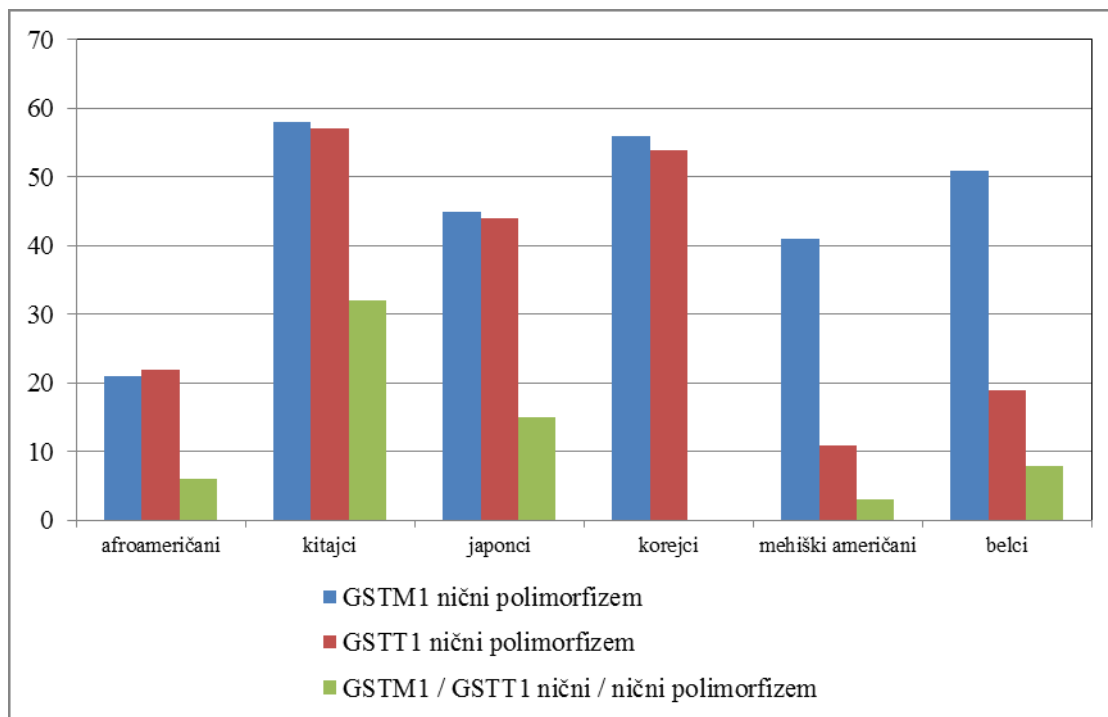
Študije so do danes pokazale, da se izražanje in merjenje koncentracije glutation S-transferaz pri karcinogenezi lahko izkoristi kot tumorski kazalec. Izražanje izoencima GSTP1, ki je najbolj distribuiran po telesu, povezujejo z razvojem rezistence tumorjev na običajno uporabljena protitumorska zdravila (18).

1.5.3 Polimorfizmi genskih zapisov za glutation S-transferaze (GST)

Genski zapisi za glutation S-transferaze so polimorfni. Najpogostejša polimorfizma GSTM1 in GSTT1 sta nična polimorfizma, kot posledica homozigotne delecije (18). Genski zapis za GSTM1 se nahaja na kromosomu 1, medtem ko se genski zapis za GSTT1 nahaja na kromosomu 22 (20). Približno 50 % belcev je homozigotov za delecijo GSTM1, kar ima za posledico odsotnost encimske aktivnosti. Homozigotov za delecijo GSTT1, ki ima za posledico prav tako odsotnost encimske aktivnosti, je 10-20 % belcev in približno 50 % Azijcev. Pri GSTT1 sta znana dva polimorfizma, ki imata za posledico zamenjavo aminokislin in s tem nižjo aktivnost encima (16).

Nekatere raziskave so pokazale, da je nični polimorfizem GSTM1 povezan s povečanim tveganjem za razvoj azbestoze, spet druge raziskave tega dejstva niso uspele potrditi (18, 33). Pomembna ugotovitev raziskovalcev je, da ima prisotnost ničnega polimorfizma GSTT1 celo zaščitni vpliv pred nastankom azbestoze, kar naj bi bila posledica sposobnosti GSTT1, da lahko katalizira reakcije, ki privedejo do nastanka bolj reaktivnega in posledično bolj škodljivega konjugata z glutationom. Zaradi prisotnosti ničnega polimorfizma GSTT1 in posledično odsotne encimske aktivnosti do nastanka takega škodljivega konjugata ne more priti. Glede na to, da azbestoza predstavlja dejavnik tveganja za razvoj pljučnega raka, so raziskovalci sklepali, da ima prisotnost ničnega polimorfizma GSTT1 lahko tudi zaščitni vpliv pred nastankom raka pljuč (16).

Povezava med azbestozo in prisotnostjo genskega polimorfizmom GSTP1, ki nosi zapis za encim z visoko konjugacijsko kapaciteto, je bila v študijah statistično potrjena, tako naj bi prisotnost omenjenega genskega polimorfizma GSTP1 povečala tveganje za razvoj azbestoze kar za 50 % (21).



Slika 10: Pogostost ničnega polimorfizma GSTM1 in GSTT1 pri različnih etničnih skupinah (Za nični polimorfizem GSTM1/GSTT1 pri Korejcih ni podatka) (20).

Nični polimorfizem GSTM1 povezujejo s povečanim tveganjem za razvoj raka pljuč, želodca in črevesja ter raka materničnega vratu, medtem ko je nični polimorfizem GSTT1 povezan s povečanim tveganjem za razvoj raka dojke, črevesja, trebušne slinavke, pljuč in limfoma. Polimorfizmi glutation S-transferaze pri človeku igrajo ključno vlogo tudi pri odzivu organizma na ksenobiotike in kemoterapevtike pri onkoloških bolnikih (18)

Podrobnejše raziskave na področju polimorfizmov GSTs so opisane in primerjane z izsledki naše raziskave v poglavju Rezultati in razprava.

2 NAMEN DELA

V magistrski nalogi se osredotočamo na ugotavljanje statistično značilnih razlik v genskih polimorfizmih glutation S-transferaze M1 (GSTM1) in glutation S-transferaze T1 (GSTT1), med skupinama bolnikov z azbestozo in bolnikov s plevralnimi plaki, in sicer z uporabo metod deskriptivne statistike in testa χ^2 .

Namen našega dela je torej ugotoviti, ali med skupinama bolnikov z azbestozo in bolnikov s plevralnimi plaki obstajajo statistično pomembne razlike v prisotnosti genskih polimorfizmov GSTM1 in/ali GSTT1. S primerjavo rezultatov med omenjenima skupinama želimo raziskati, ali prisotnost polimorfizma GSTM1 in/ali GSTT1 predstavlja dejavnik tveganja za nastanek azbestoze. Zanima nas tudi, zakaj nekatere osebe zbolijo za azbestozo, druge pa le za blago obliko bolezni (plevralni plaki), kljub temu, da so bili izpostavljeni azbestu v približno enaki meri in v približno enakem časovnem obdobju.

V nalogi bomo prikazali tudi primerjavo prisotnosti genskih polimorfizmov GSTM1 in GSTT1 med skupino bolnikov z azbestozo in skupino zdravih posameznikov, ki so bili izpostavljeni azbestu, vendar niso zboleli za nobeno boleznijo, ki bi bila povezana s tem.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V raziskavi smo primerjali rezultate treh skupin preiskovancev. Skupino ljudi z azbestozo smo primerjali s skupino ljudi s plevralnimi plaki (kontrolna skupina 1), informativno pa smo dodali tudi primerjavo med skupino z azbestozo s skupino zdravih posameznikov (kontrolna skupina 2). V vsaki od skupin smo imeli po 50 preiskovancev, ki so bili poklicno izpostavljeni azbestu.

Skupine preiskovancev smo statistično razdelili po spolu, kajenju in starosti v času obravnave.

Podatki o spolu, starosti, kajenju in vrsti bolezni, povezani z izpostavljenostjo azbestu so bili pridobljeni iz dokumentacije (na podlagi osebnega intervjuja izvedenega s strani raziskovalca vključenega v projekt) v okviru projektov ARRS L3-9129 in P1-0170 in so podrobneje prikazani v poglavju Rezultati in razprava v nadaljevanju naloge.

3.2 GENSKE ANALIZE

Vzorci krvi za gensko analizo so bili odvzeti v okviru projektov ARRS L3-9129 in P1-0170, prav tako so bili iz omenjenega projekta pridobljeni rezultati genske analize. Preiskovanci so bili s študijo v okviru omenjenega projekta seznanjeni in so se z njo strinjali.

Za izolacijo deoksiribonukleinske kisline (DNA) in genotipizacijo je bila preiskovancem odvzeta kapilarna kri na FTA (Fitzco/ Flinders Technology Agreement) mini kartice (Whatmann Bioscience, Velika Britanija), ki so narejene za zbiranje krvi pri sobni temperaturi, transport in shranjevanje do same analize, ter za čiščenje nukleinskih kislin iz vzorca.

DNA je bila iz mini kartic FTA izolirana z reagenti »Blood Prep« na aparatu za izolacijo nukleinskih kislin »ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA). Vzorci so bili do genotipizacije hranjeni pri – 20 °C.

3.2.1 Verižna reakcija polimerizacije (PCR) v realnem času

Za določanje genskih polimorfizmov GSTM1 in GSTT1 je bila uporabljena verižna reakcija polimerizacije (PCR) v realnem času.

Reakcijsko zmes za verižno reakcijo polimerizacije (PCR) sestavljajo vzorec DNA, dva oligonukleotidna začetnika, deoksinukleozid-trifosfat, Mg^{2+} ioni, termostabilna DNA polimeraza in reakcijski pufer. Vsaka od sestavin v ciklični reakciji, ki poteka v treh stopnjah (denaturacija, prileganje oligonukleotidnih začetnikov in izgrajevanje komplementarne verige), ima svojo vlogo (22).

Vzorec DNA služi kot matrica, z oligonukleotidnima začetnikoma se omeji odsek, ki se pomnožuje, deoksinukleozid-trifosfat pa predstavlja gradnike za nove verige DNA. DNA polimeraza ima vlogo encima in je termostabilna, kar omogoča boljšo specifičnost reakcije. Mg^{2+} ioni igrajo vlogo kofaktorjev termostabilnih DNA-polimeraz, medtem ko reakcijski pufer uravnava pH, kar vpliva na aktivnost same DNA-polimeraze (22).

V stopnji denaturacije pride do razklenitve verige DNA in tako iz enoverižne dobimo dvoverižno DNA. V naslednji stopnji (pri nižji temperaturi) pride do prileganja nukleotidnih začetnikov na enoverižni DNA verigi. V naslednji fazi se veže termostabilna DNA polimeraza na oligonukleotidni začetnik, pri čemer pride do izgrajevanja nove komplementarne verige DNA (22).

Pri metodi PCR v realnem času sta pomnoževanje in detekcija produktov združeni, zato predstavlja nadgradnjo klasičnega PCR. Produkt lahko detektiramo nespecifično z uporabo fluorescentnih barvil, ki se nespecifično vežejo na DNA, ali specifično z uporabo s fluorofori označenih oligonukleotidov oz. sond, ki se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo.

Bistvena prednost metode PCR v realnem času je lažja kvantifikacija nukleinskih kislin. Uporablja se za detekcije večjih preureditev DNA, kot so delne delecije genov, genske preureditve in kromosomske translokacije (22).

3.3 STATISTIČNE ANALIZE

Za obdelavo podatkov vseh treh skupin preiskovancev smo uporabili osnovno deskriptivno statistiko (povprečje, mediana in standardni odklon), ter test χ^2 , s katerim smo ugotavljali ali med preiskovanimi skupinami obstajajo statistično pomembne razlike. Ugotavljanje razlik med skupinami s testom χ^2 smo opravili z računalniškim programom SPSS (IBM, New York, ZDA).

3.3.1 Povprečna vrednost merjenega parametra

Povprečje ali povprečna vrednost je najpomembnejši statistični parameter. Povprečje je mera za srednjo vrednost statističnega znaka. Če označimo različne vrednosti statističnega znaka z $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ in njihove frekvence s $f_1, f_2, f_3, \dots, f_n$, potem povprečno vrednost izračunamo po formuli (23):

$$\bar{x} = \frac{x_1 f_1 + x_2 f_2 + x_3 f_3 + \dots + x_n f_n}{N}$$

oziroma (če uporabimo zapis s sumacijskim znakom):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{k=1}^n x_k f_k}{N}$$

(pri tem je $N = x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n$) (23).

3.3.2 Mediana

Mediana ali središčnica je statistični parameter, ki podobno kot povprečje podaja srednjo vrednost statističnega znaka. Mediano določimo tako, da vrednosti statističnega znaka najprej uredimo po velikosti od najmanjše do največje in zapišemo v obliki zaporedja členov. Mediana je vrednost, ki nastopa v sredini tako dobljenega zaporedja (število manjših členov je enako kot število večjih členov) (23).

3.3.3 Standardni odklon

Drugi najpomembnejši statistični parameter je standardni odklon ali standardna deviacija (σ). Pove nam, za koliko vrednosti statističnega znaka odstopajo od povprečja. Pravimo tudi, da je standardni odklon mera za razpršenost porazdelitve vrednosti (23).

Standardni odklon izračunamo po formuli:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(\bar{x} - x_1)^2 f_1 + (\bar{x} - x_2)^2 f_2 + (\bar{x} - x_3)^2 f_3 + \dots + (\bar{x} - x_n)^2 f_n}{N}}$$

oziroma (če uporabimo zapis s sumacijskim znakom) (23):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (\bar{x} - x_k)^2 f_k}{N}}$$

3.3.4 χ^2 - test

S testom χ^2 praviloma primerjamo opaženo porazdelitev podatkov s teoretično porazdelitvijo. Preverjamo torej, ali sta si dve porazdelitvi podobni. Če sta si porazdelitvi podobni, bodo razlike med njima praviloma majhne. Seštevek kvadratov razlik se bo porazdeljeval po χ^2 porazdelitvi. Manj ko sta si dve porazdelitvi podobni, večje so razlike med njima, večja je χ^2 statistika (24).

χ^2 porazdelitev izhaja iz normalne porazdelitve in je seštevek kvadratov razlik (24).

$$\chi^2 = \sum \frac{(f_o - f_t)^2}{f_t}$$

pri čemer je :

f_o ... opažena frekvenca

f_t ... pričakovana frekvenca (teoretična frekvenca) (24)

S χ^2 testom smo primerjali frekvence rezultatov med preiskovanimi skupinami in želeli ugotoviti ali se frekvence posameznih skupin med seboj statistično pomembno razlikujejo. Če se frekvence med seboj statistično pomembno razlikujejo, potem ugotovimo, da tudi v splošni populaciji obstajajo določene razlike in da je ta razlika prevelika, da bi šlo le za naključje. Parameter, ki nam pove ali med skupinami obstajajo statistično pomembne razlike je vrednost p . V primeru, ko je $p < 0,05$, obstaja povezava ene spremenljivke z drugo in jo lahko posplošimo na celotno populacijo. V primeru pa, ko je $p > 0,05$, pa med skupinama ni statistično pomembnih razlik.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

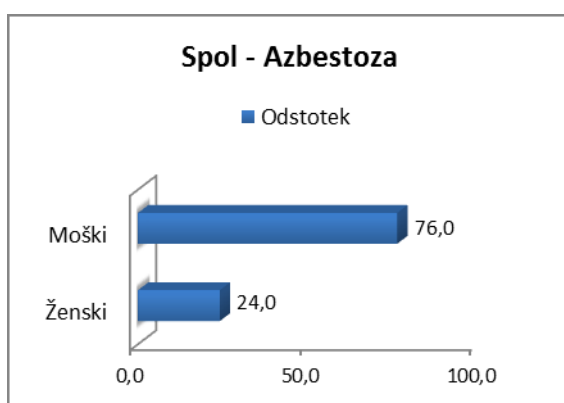
4.1 RAZDELITEV PREISKOVANCEV PO OSEBNIH ZNAČILNOSTIH

Vse tri skupine preiskovancev, in sicer skupino z azbestozo, skupino s pleuralnimi plaki (kontrolna skupina 1) ter skupino zdravih posameznikov (kontrolna skupina 2) smo razdelili po osebnih značilnostih (spol, kajenje in starost v času obravnave) in rezultate grafično prikazali v odstotkih.

1.4.1. Skupina z azbestozo

Preglednica 1: Razdelitev po spolu v skupini bolnikov z azbestozo

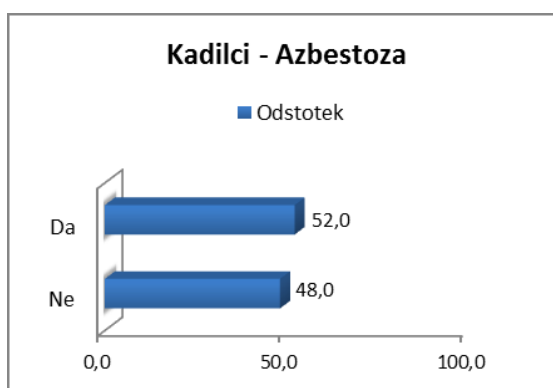
SPOL		Frekvenca
Azbestoza	Moški	38
	Ženski	12
	Skupaj	50



Graf 1: Razdelitev po spolu (v %) v skupini bolnikov z azbestozo

Preglednica 2: Razdelitev ljudi po številu kadilcev in nekadilcev v skupini z azbestozo

KADILCI		Frekvenca
Azbestoza	Da	26
	Ne	24
	Skupaj	50



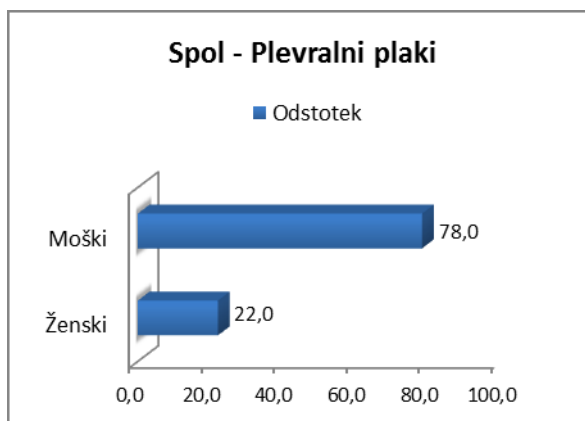
Graf 2: Razdelitev ljudi med kadilce in nekadilce (v %) v skupini z azbestozo

V skupini preiskovancev z azbestozo je bilo obravnavanih 38 moških, ki predstavlja 76 % in 12 žensk, kar pomeni 24 %. Med njimi je bilo 26 kadilcev, kar ustreza 52 % preiskovancev in 24 nekadilcev, kar predstavlja 48 % delež preiskovancev.

4.1.1 Skupina s pleuralnimi plaki (kontrolna skupina 1)

Preglednica 3: Razdelitev ljudi po spolu v skupini s pleuralnimi plaki

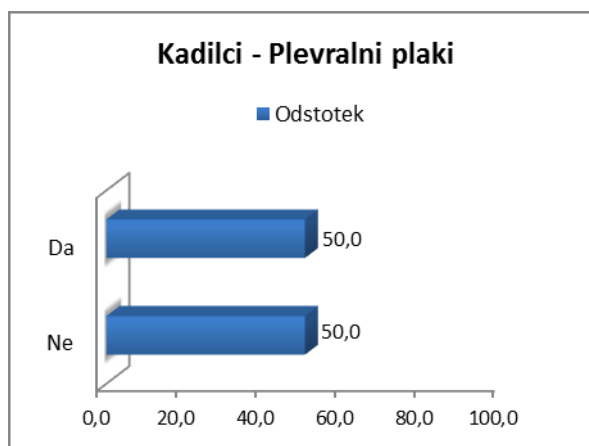
SPOL		Frekvenca
Plevralni plaki	Moški	39
	Ženski	11
	Skupaj	50



Graf 3: Razdelitev po spolu (v %) v skupini s pleuralnimi plaki

Preglednica 4: Razdelitev ljudi po številu kadilcev in nekadilcev v skupini s pleuralnimi plaki

KAJENJE		Frekvenca
Plevralni plaki	Da	25
	Ne	25
	Skupaj	50



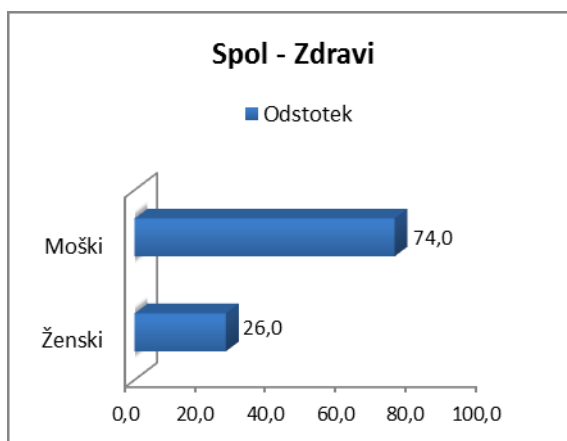
Graf 4: Razdelitev ljudi med kadilce in nekadilce (v %) v skupini s pleuralnimi plaki

V skupini preiskovancev s plevralnimi plaki je bilo obravnavanih 39 moških, kar predstavlja 78 % obravnavanih preiskovancev, medtem ko je bil delež žensk 22 % (11 preiskovank). Med njimi je bilo polovica kadilcev (50 %) in polovica nekadilcev (50 %).

4.1.2 Skupina zdravih posameznikov (kontrolna skupina 2)

Preglednica 5: Razdelitev ljudi po spolu v skupini zdravih ljudi

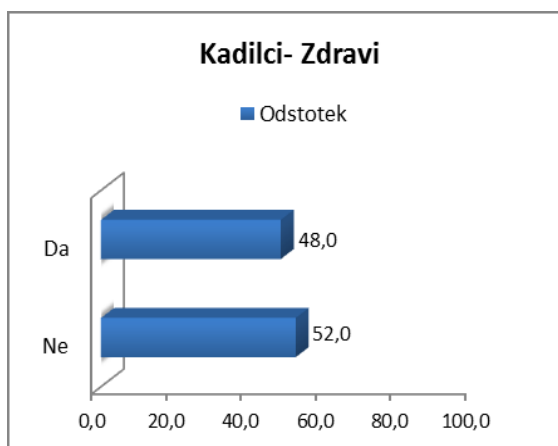
SPOL		Frekvenca
Zdravi	Moški	37
	Ženski	13
	Skupaj	50



Graf 5: Razdelitev po spolu (v %) v skupini zdravih ljudi

Preglednica 6: Razdelitev ljudi po številu kadilcev in nekadilcev v skupini zdravih ljudi

KADILCI		Frekvenca
Zdravi	Da	24
	Ne	26
	Skupaj	50



Graf 6: Razdelitev ljudi med kadilce in nekadilce (v %) v skupini zdravih ljudi

V skupini zdravih preiskovancev je bilo obravnavanih 37 moških, kar pomeni 74 % delež preiskovancev in 13 žensk, kar pomeni 26 % delež preiskovank, med njimi je bilo 24 kadilcev (48 %) in 26 nekadilcev (52 %).

Ugotovili smo, da v vseh treh skupinah prevladuje moška populacija, razmerje kadilcev in nekadilcev je v vseh treh skupinah podobno in znaša približno 50 : 50 ($\pm 2\%$).

4.1.3 Primerjava med povprečno starostjo preiskovancev za vse tri skupine

Preglednica 7: Podatki o povprečni starosti preiskovancev (mediana, minimalna in maksimalna vrednost ter standardni odklon) za vse tri skupine preiskovancev

STAROST V LETU OBRAVNAVE	N	Povprečje (leta)	Mediana	Minimalna vrednost (leta)	Maksimalna vrednost (leta)	Standardni odklon (%)
	Veljavnih					
Azbestoza	50	63,2	63,0	45	82	9,6
Plevralni plaki	50	57,9	56,0	43	86	10,6
Zdravi	50	56,5	54,0	38	78	9,4

Povprečna starost v skupini z azbestozo je bila 63,2 let, mediana 63 let, pri čemer je bila starost najmlajšega preiskovanca 45 let, starost najstarejšega pa 82 let. Standardni odklon je bil 9,6 %.

V skupini s plevralnimi plaki je bila povprečna starost skoraj 58 let, mediana 56 let, starost najmlajšega preiskovanca je bila 43 let, starost najstarejšega pa 86 let. Standardni odklon je bil 10,6 %. V skupini zdravih je bila povprečna starost 56,5 leta, mediana 54 let, starost najmlajšega preiskovanca 38 let, starost najstarejšega pa 78 let. Standardni odklon je bil 9,4 %.

4.1.4 Razdelitev preiskovancev znotraj posameznih skupin po spolu in kadilcih oz. nekadilcih glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTM1

Znotraj posameznih preiskovanih skupin smo preiskovance razdelili po spolu in kadilcih oz. nekadilcih in ovrednotili pogostost prisotnosti oz. odsotnosti genskega polimorfizma GSTM1 v odstotkih. Rezultati so zbrani v preglednicah od 8 do 13.

Preglednica 8: Razdelitev kadilcev oz. nekadilcev glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTM1 v skupini z azbestozo.

AZBESTOZA	kadilci	nekadilci
Prisotnost polimorfizma GSTM1	35 %	54 %
Odsotnost polimorfizma GSTM1	65 %	46 %
skupaj	100 %	100 %

Preglednica 9: Razdelitev kadilcev oz. nekadilcev glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTM1 v skupini s plevralnimi plaki.

PLEVRALNI PLAKI	kadilci	nekadilci
Prisotnost polimorfizma GSTM1	48 %	40 %
Odsotnost polimorfizma GSTM1	52 %	60 %
skupaj	100 %	100 %

Preglednica 10: Razdelitev kadilcev oz. nekadilcev glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTM1 v skupini zdravih.

ZDRAVI	kadilci	nekadilci
Prisotnost polimorfizma GSTM1	46 %	42 %
Odsotnost polimorfizma GSTM1	54 %	58 %
skupaj	100 %	100 %

Preglednica 11: Razdelitev po spolu glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTM1 v skupini z azbestozo.

AZBESTOZA	moški	ženske
Prisotnost polimorfizma GSTM1	44 %	45 %
Odsotnost polimorfizma GSTM1	56 %	55 %
skupaj	100 %	100 %

Preglednica 12: Razdelitev po spolu glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTM1 v skupini s plevralnimi plaki.

PLEVRALNI PLAKI	moški	ženske
Prisotnost polimorfizma GSTM1	46 %	46 %
Odsotnost polimorfizma GSTM1	54 %	54 %
skupaj	100 %	100 %

Preglednica 13: Razdelitev po spolu glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTM1 v skupini zdravih.

ZDRAVI	moški	ženske
Prisotnost polimorfizma GSTM1	46 %	36 %
Odsotnost polimorfizma GSTM1	54 %	64 %
skupaj	100 %	100 %

Kot je razvidno iz rezultatov, ki so zbrani v preglednicah od 8 do 13, je pogostost prisotnosti genskega polimorfizma GSTM1 med skupinami pri razdelitvi na spol ter na kadilce oz. nekadilce, primerljiva. Genski polimorfizem GSTM1 pri kadilcih v skupini z azbestozo je prisoten pri 35 % preiskovancev, pri nekadilcih pa je ta vrednost za približno 20 % višja (54% preiskovancev). V skupini s plevralnimi plaki je prisotnost genskega polimorfizma GSTM1 pri kadilcih potrjena pri 48 % preiskovancev, pri nekadilcih pa pri 40 % preiskovancev. Prisotnost genskega polimorfizma GSTM1 pri kadilcih v skupini zdravih znaša 46 %, pri nekadilcih pa 42 %.

Pri razdelitvi skupin glede na spol so rezultati prisotnosti genskega polimorfizma GSTM1 prav tako zelo podobni, saj je v skupini z azbestozo prisoten pri 44 % moških in 45 % žensk, v skupini s plevralnimi plaki pri 46 % moških in 46 % žensk ter v skupini zdravih posameznikov pri 46 % moških in 36 % žensk.

4.1.5 Razdelitev preiskovancev znotraj posameznih skupin po spolu in kadilcih oz. nekadilcih glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTT1

Znotraj posameznih preiskovanih skupin smo preiskovance razdelili po spolu in kadilcih oz. nekadilcih in ovrednotili pogostost prisotnosti oz. odsotnosti genskega polimorfizma GSTT1 v odstotkih. Rezultati so zbrani v preglednicah od 14 do 19.

Preglednica 14: Razdelitev kadilcev oz. nekadilcev glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTT1 v skupini z azbestozo

AZBESTOZA	kadilci	Nekadilci
Prisotnost polimorfizma GSTT1	88 %	84 %
Odsotnost polimorfizma GSTT1	12 %	16 %
skupaj	100 %	100 %

Preglednica 15: Razdelitev kadilcev oz. nekadilcev glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTT1 v skupini s plevralnimi plaki.

PLEVRALNI PLAKI	kadilci	nekadilci
Prisotnost polimorfizma GSTT1	100 %	92 %
Odsotnost polimorfizma GSTT1	0 %	8 %
skupaj	100 %	100 %

Preglednica 16: Razdelitev kadilcev oz. nekadilcev glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTT1 v skupini zdravih.

ZDRAVI	kadilci	nekadilci
Prisotnost polimorfizma GSTT1	88 %	81 %
Odsotnost polimorfizma GSTT1	12 %	12 %
skupaj	100 %	100 %

Preglednica 17: Razdelitev po spolu glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTT1 v skupini z azbestozo.

AZBESTOZA	moški	ženske
Prisotnost polimorfizma GSTT1	86 %	77 %
Odsotnost polimorfizma GSTT1	14 %	23 %
skupaj	100 %	100 %

Preglednica 18: Razdelitev po spolu glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTT1 v skupini z azbestozo.

PLEVRALNI PLAKI	moški	ženske
Prisotnost polimorfizma GSTT1	97 %	91 %
Odsotnost polimorfizma GSTT1	3 %	9 %
skupaj	100 %	100 %

Preglednica 19: Razdelitev po spolu glede na prisotnost oz. odsotnost genskega polimorfizma GSTT1 v skupini z zdravih.

ZDRAVI	moški	ženske
Prisotnost polimorfizma GSTT1	87 %	83 %
Odsotnost polimorfizma GSTT1	13 %	17 %
skupaj	100 %	100 %

Iz rezultatov, ki so zbrani v Preglednicah od 14 do 19, je pogostost prisotnosti genskega polimorfizma GSTT1 med skupinami pri razdelitvi na spol ter na kadilce oz. nekadilce podobna. Genski polimorfizem GSTT1 pri kadilcih v skupini z azbestozo je prisoten pri 88 % preiskovancev, pri nekadilcih pa pri 84 % preiskovancev. V skupini s pleuralnimi plaki je prisotnost genskega polimorfizma GSTT1 potrjena pri vseh kadilcih, saj znaša 100%, pri nekadilcih pa 92 %. Prisotnost genskega polimorfizma GSTT1 pri kadilcih v skupini zdravih znaša 88 %, pri nekadilcih pa 81 %.

Pri razdelitvi skupin glede na spol so rezultati prisotnosti genskega polimorfizma GSTT1 prav tako zelo podobni, saj je v skupini z azbestozo prisoten pri 86 % moških in 77 % žensk, v skupini s plevralnimi plaki pri 97 % moških in 91 % žensk, ter v skupini zdravih posameznikov pri 87 % moških in 83 % žensk.

Kot je razvidno iz zgornjih preglednic je pojavnost genskega polimorfizma GSTM1 in GSTT1 glede na spol in glede na razdelitev preiskovancev na kadilce oz. nekadilce med skupinami zelo podobna, saj večjih odstopanj v odstotkih med skupinami ni zaznati. Pomembno je opozoriti, da je razdelitev glede na spol pri ženskah težavna in nam verjetno ne nudi pravega vpogleda v pojavnost polimorfizma, saj so odstotki pojavnosti genskega polimorfizma pri ženskah izračunani iz populacije, ki je skoraj štirikrat manjša, kot je populacija moških. To dejstvo je seveda razumljivo, če vemo, da so bili v Sloveniji poklicno izpostavljeni azbestu večinoma moški.

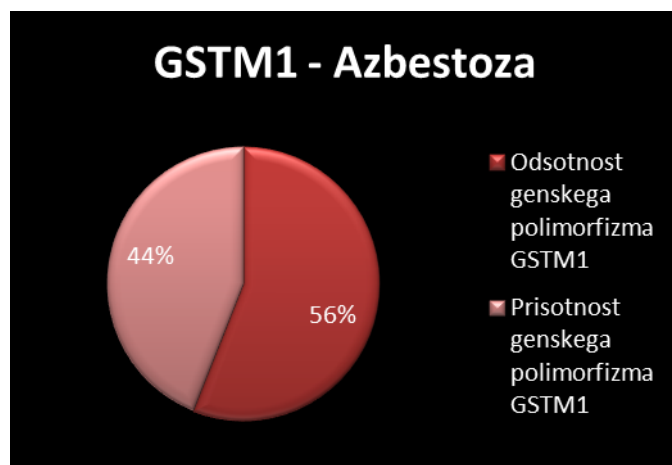
4.2 STATISTIČNA ANALIZA – χ^2 – TEST

Za ugotavljanje statistično pomembnih razlik med genetskimi polimorfizmi med vsemi tremi skupinami smo uporabili χ^2 – test in statistično analizo izvedli z računalniškim programom SPSS (IBM, New York, ZDA). Rezultate genetskih polimorfizmov skupine z azbestozo smo najprej primerjali z rezultati genetskih polimorfizmov skupine s plevralnimi plaki (kontrolna skupina 1), nato pa še s skupino zdravih posameznikov (kontrolna skupina 2). To smo storili dvakrat in sicer enkrat za rezultate genskega polimorfizma GSTM1 in nato še za rezultate genskega polimorfizma GSTT1.

4.2.1 Primerjava med skupinami za rezultate genskega polimorfizma GSTM1.

Preglednica 20: Podatki o odsotnosti / prisotnosti genskega polimorfizma GSTM1 v skupini bolnikov z azbestozo

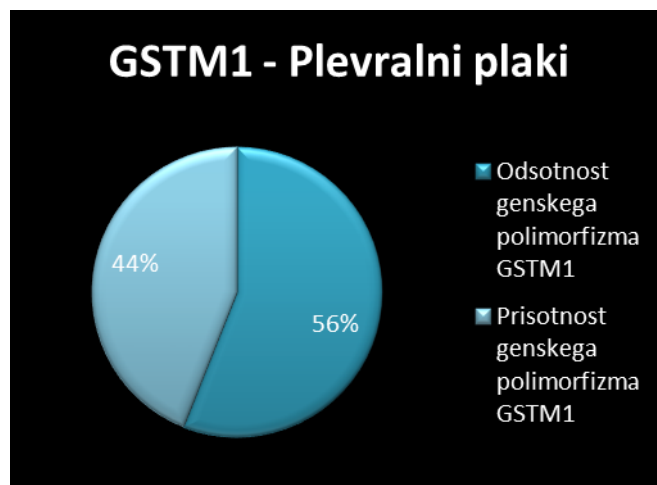
		Frekvenca
Azbestoza	Odsotnost genskega polimorfizma GSTM1	28
	Prisotnost genskega polimorfizma GSTM1	22
	Skupaj	50



Graf 7: Podatki o odsotnosti / prisotnosti genskega polimorfizma GSTM1 (v %) v skupini z azbestozo

Preglednica 21: Podatki o odsotnosti / prisotnosti genskega polimorfizma GSTM1 v skupini s plevralnimi plaki

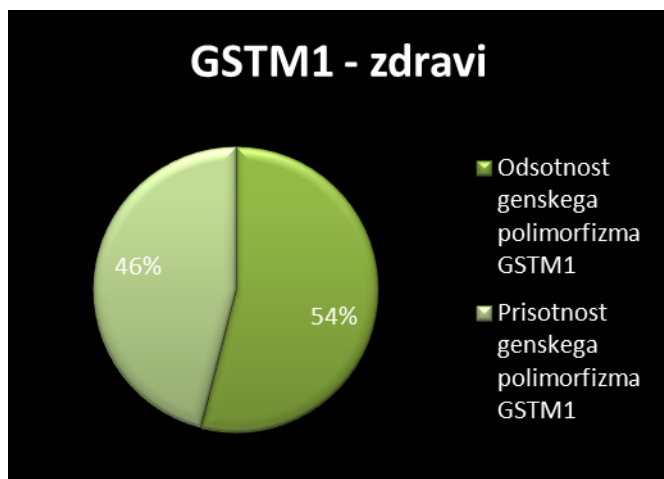
		Frekvenca
Plevralni plaki (kontrola 1)	Odsotnost genskega polimorfizma GSTM1	28
	Prisotnost genskega polimorfizma GSTM1	22
	Skupaj	50



Graf 8: Podatki o odsotnosti / prisotnosti genskega polimorfizma GSTM1 (v %) v skupini s plevralnimi plaki

Preglednica 22: Podatki o odsotnosti / prisotnosti genskega polimorfizma GSTM1 v skupini zdravih

		Frekvenca
Zdravi (kontrola 2)	Odsotnost genskega polimorfizma GSTM1	27
	Prisotnost genskega polimorfizma GSTM1	23
	Skupaj	50



Graf 9: Podatki o odsotnosti / prisotnosti genskega polimorfizma GSTM1 (v %) v skupini zdravih

Preglednica 23: Statistični rezultati primerjave genskega polimorfizma GSTM1 med skupino z azbestozo in skupino s plevralnimi plaki.

	Vrednost testa	df	p-vrednost
hi-kvadrat	1,773	1	0,183
N veljavnih	50		

Preglednica 24: Statistični rezultati primerjave genskega polimorfizma GSTM1 med skupino z azbestozo in skupino zdravih posameznikov

	Vrednost testa	df	p-vrednost
hi-kvadrat	0,253	1	0,615
N veljavnih	50		

Rezultat statistične analize je p-vrednost, ki nam pove, ali med skupinami, ki smo jih primerjali, obstajajo statistično pomembne razlike. V primeru, ko je $p < 0,05$, obstaja

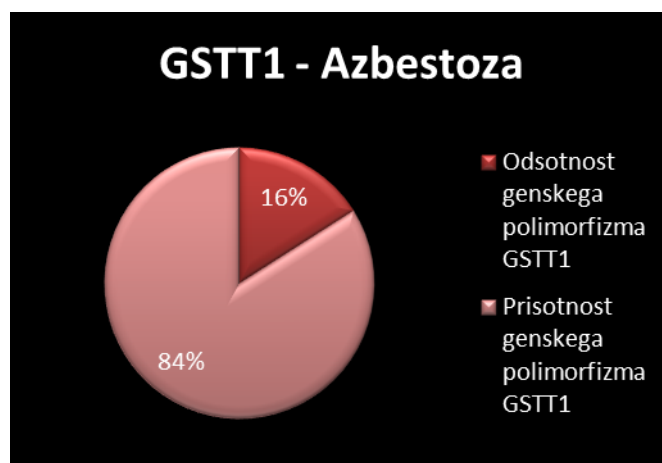
povezava ene spremenljivke z drugo in lahko povezavo posplošimo na celotno populacijo. V primeru, ko je $p > 0,05$, pa med skupinama ni statistično pomembnih razlik.

Pri statistični analizi oz. primerjavi med skupino z azbestozo in skupino s plevralnimi plaki za rezultate genskega polimorfizma GSTM1 je p – vrednost 0,183 (Preglednica 23), pri statistični analizi oz. primerjavi med skupino z azbestozo in skupino zdravih posameznikov pa je p – vrednost 0,615 (Preglednica 24). Pri obeh statističnih primerjavah je bila vrednost $p > 0,05$, kar pomeni, da ni statistično pomembnih razlik v prisotnosti oz. odsotnosti genskega polimorfizma GSTM1 med skupino z azbestozo in skupino s plevralnimi plaki. Ugotovili smo tudi, da ni statistično pomembnih razlik v prisotnosti oz. odsotnosti genskega polimorfizma GSTM1 med skupino z azbestozo in skupino zdravih posameznikov.

4.2.2 Primerjava med skupinami za rezultate genskega polimorfizma GSTT1

Preglednica 25: Podatki o odsotnosti / prisotnosti genskega polimorfizma GSTT1 v skupini bolnikov z azbestozo

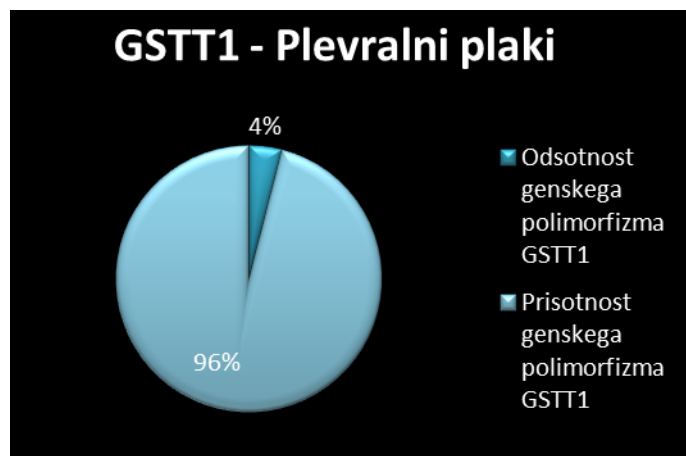
		Frekvenca
Azbestoza	Odsotnost genskega polimorfizma GSTT1	8
	Prisotnost genskega polimorfizma GSTT1	42
	Skupaj	50



Graf 10: Podatki o odsotnosti / prisotnosti genskega polimorfizma GSTT1 (v %) v skupini bolnikov z azbestozo

Preglednica 26: Podatki o odsotnosti / prisotnosti genskega polimorfizma GSTT1 v skupini bolnikov s plevralnimi plaki

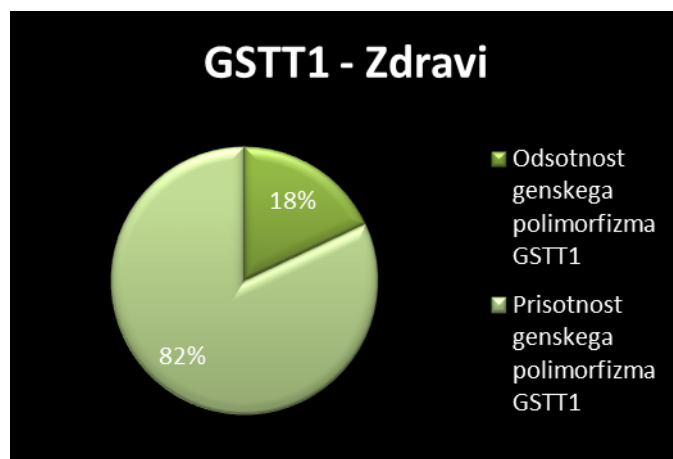
		Frekvenca
Plevralni plaki (kontrola 1)	Odsotnost genskega polimorfizma GSTT1	2
	Prisotnost genskega polimorfizma GSTT1	48
	Skupaj	50



Graf 11: Podatki o odsotnosti / prisotnosti genskega polimorfizma GSTT1 (v %) v skupini bolnikov s plevralnimi plaki

Preglednica 27: Podatki o odsotnosti / prisotnosti genskega polimorfizma GSTT1 v skupini zdravih

		Frekvenca
Zdravi (kontrola 2)	Odsotnost genskega polimorfizma GSTT1	9
	Prisotnost genskega polimorfizma GSTT1	41
	Skupaj	50



Graf 12: Podatki o odsotnosti / prisotnosti genskega polimorfizma GSTT1 (v %) v skupini zdravih oseb.

Preglednica 28: Statistični rezultati primerjave genskega polimorfizma GSTT1 med skupinama bolnikov z azbestozo in s plevralnimi plaki.

	Vrednost testa	df	p-vrednost
hi-kvadrat	1,315	1	0,252
N veljavnih	50		

Preglednica 29: Statistični rezultati primerjave genskega polimorfizma GSTT1 med skupino z azbestozo in skupino zdravih posameznikov.

	Vrednost testa	df	p-vrednost
hi-kvadrat	0,295	1	0,587
N veljavnih	50		

Pri statistični analizi oz. primerjavi med skupino z azbestozo in skupino s plevralnimi plaki za rezultate genetskega polimorfizma GSTT1 je p - vrednost 0,252 (Preglednica 28), pri statistični analizi oz. primerjavi med skupino z azbestozo in skupino zdravih posameznikov pa je p – vrednost 0,587 (Preglednica 29). p – vrednost je pri obeh statističnih primerjavah večja od 0,05, kar pomeni, da ni statistično pomembnih razlik v prisotnosti oz. odsotnosti genskega polimorfizma GSTT1 med skupino z azbestozo in skupino s plevralnimi plaki. Ugotovili smo tudi, da ni statistično pomembnih razlik v prisotnosti oz. odsotnosti genskega polimorfizma GSTT1 med skupino z azbestozo in skupino zdravih posameznikov.

V literaturi je zaslediti mnogo študij, ki raziskujejo vplive različnih encimskih sistemov na razvoj bolezni povezanih z izpostavljenostjo azbestnim vlaknom. Primerjava prisotnosti genskih polimorfizmov GSTM1 in GSTT1 med skupino bolnikov z azbestozo in skupino bolnikov s plevralnimi plaki, ki jo obravnavamo v naši nalogi, je raziskava, ki je bila opravljena prvič, saj jo v nam dostopni literaturi nismo zasledili.

S pomočjo deskriptivne statistike smo obdelali podatke o starosti preiskovancev za vse tri obravnavane skupine. Ugotovili smo, da je v skupini z azbestozo populacija najstarejša, saj je

bila povprečna starost v skupini z azbestozo 63 let (standardni odklon 9,2 %), v skupini s plevralnimi plaki 58 let (standardni odklon 10,6 %) in v skupini zdravih ljudi 56,5 let (standardni odklon 9,4 %). Iz omenjenih podatkov o starosti bi lahko sklepali, da je starost posameznika dodaten dejavnik tveganja za nastanek bolezni, kot je azbestoza, hkrati pa bi bil lahko razlog za nastanek azbestoze v skupini z najvišjo starostjo tudi posledično daljša latentna doba (to je čas od prve izpostavljenosti azbestu do pojava bolezni).

Pri razdelitvi preiskovancev glede na spol in glede na zgodovino razvade kot je kajenje znotraj posameznih skupin bolnikov z azbestozo, bolnikov s plevralnimi plaki in skupino zdravih posameznikov, nismo ugotovili večjih odstopanj v prisotnosti oz. odsotnosti genskih polimorfizmov GSTM1 in GSTT1 med posameznimi skupinami.

Pri statistični analizi in raziskavi, ki smo jo opravili s χ^2 testom s pomočjo računalniškega programa SPSS, nismo uspeli dokazati statistično pomembnih razlik v prisotnosti oz. odsotnosti genskih polimorfizmov GSTM1 in GSTT1 med skupino bolnikov z azbestozo in skupino bolnikov s plevralnimi plaki. Prav tako nismo uspeli dokazati statistično pomembnih razlik v prisotnosti oz. odsotnosti genskih polimorfizmov GSTM1 in GSTT1 med skupino bolnikov z azbestozo in skupino zdravih posameznikov. Slednjo primerjavo smo v nalogo vključili informativno.

Iz rezultatov, ki smo jih dobili pri naši raziskavi, bi lahko sklepali, da genetske značilnosti ne igrajo pomembnejše vloge pri nastanku bolezni, kot je azbestoza, glede na to, da med skupinami ni statistično pomembnih razlik v prisotnosti oz. odsotnosti genskih polimorfizmov GSTM1 in GSTT1. Nekoliko drugačne so ugotovitve v različnih študijah, ki jih navajamo v nadaljevanju naloge in ki nakazujejo, da genetski vpliv različnih encimskih sistemov na pojav bolezni, kot je azbestoza, ni nezanemarljiv (16, 21, 25).

V pregledani literaturi smo zasledili raziskave, ki so obravnavale povezave med genetskimi polimorfizmi GSTM1 in razvojem bolezni, kot je azbestoza. V študiji so raziskovalci uporabili skupino 658 ljudi (za kontrolno skupino so uporabili skupino 568 zdravih ljudi), ki so bili poklicno izpostavljeni azbestu in dokazali statistično povezavo med prisotnostjo genskega polimorfizma GSTM1 in pojavom azbestoze (25). Enako primerjavo med genskim polimorfizmom GSTM1 med skupino z azbestozo in skupino zdravih smo izvedli tudi mi in jo v nalogo vključili informativno, vendar se ugotovitev, da ni statistično pomembnih razlik med skupinama, razlikuje od omenjene raziskave. Pomembno dejstvo, ki ga je potrebno omeniti, ko primerjamo ti dve raziskavi, je, da je bila naša študija narejena na bistveno manjšem vzorcu preiskovancev, kar bi lahko imelo bistven vpliv na statistični rezultat in posledično izid raziskave. Glede na število izpostavljenih ljudi azbestu v Sloveniji je velikost

vzorca, ki smo ga imeli na razpolago, za slovenske razmere realna in sicer 50 ljudi v skupini z azbestozo, 50 ljudi v skupini s plevralnimi plaki in 50 zdravih posameznikov.

V drugi raziskavi so raziskovalci obravnavali povezave genetskih polimorfizmov GSTT1 na pojav azbestoze. Raziskava je bila opravljena na skupini 262 ljudi z azbestozo in 265 zdravih ljudi, ki so bili dolgotrajno, poklicno izpostavljeni azbestu. Ugotovitve raziskave so bile presenetljive, saj so raziskovalci ugotovili, da ima prisotnost genetskega polimorfizma GSTT1 celo zaščitni vpliv in varuje pred nastankom azbestoze, saj se je ta bolezen v manjši meri pojavljala pri ljudeh, ki so imeli prisotno delecijo gena GSTT1. Glede na to, da je azbestoza dejavnik tveganja za nastanek raka pljuč, omenjeni polimorfizem GSTT1 verjetno zmanjša tveganje tudi za nastanek pljučnega raka (16).

Na isti skupini preiskovancev so bile opravljene tudi raziskave vpliva genetskega polimorfizma GSTP1 na pojav azbestoze, pri čemer so statistične analize pokazale, da prisotnost omenjenega polimorfizma GSTP1 poveča tveganje za nastanek azbestoze kar za 50 % (21).

V literaturi je moč zaslediti tudi raziskave o vplivih genskih polimorfizmov drugih encimskih sistemov. Za prisotnost polimorfizma SOD2 (genotip SOD2 – 9 Ala/Ala) je bilo ugotovljeno, da poveča tveganje za nastanek azbestoze, kar pomeni, da tudi genetski dejavniki igrajo določeno vlogo pri nastanku azbestoze. Rahlo povečano tveganje za nastanek azbestoze so imeli tudi preiskovanci s prisotnim genskim polimorfizmom CAT-262 TT, medtem ko so bili rezultati preiskav za iNOS statistično neznačilni in se povezave ni dalo potrditi (3,26).

Cilj naše raziskovalne naloge je bil dokazati povezavo med prisotnostjo genskega polimorfizma GSTM1 in/ali GSTT1 ter pojavom azbestoze, pri čemer smo za kontrolno skupino uporabili populacijo ljudi, ki so bili izpostavljeni azbestu, posledično pa so zboleli za plevralnimi plaki. Zanimivo je bilo namreč dejstvo, zakaj določena populacija ljudi zboli za azbestozo, določena populacija ljudi pa za manj nevarno obliko bolezni, kot so plevralni plaki, pri čemer sta bili obe skupini ljudi poklicno izpostavljeni azbestu. Glede na rezultate naše raziskave nismo ugotovili statistično pomembnih razlik med skupino z azbestozo in skupino s plevralnimi plaki in tako ne moremo potrditi, da prisotnost omenjenih genetskih polimorfizmov GSTM1 in/ali GSTT1 igra vlogo pri nastanku azbestoze.

5 SKLEP

Azbestoza se je v poznih 90 letih pokazala kot eden večjih družbeno-zdravstvenih problemov. V tem obdobju so namreč začeli zbolevati ljudje, ki so bili azbestu poklicno izpostavljeni v 60. in 70. letih, in šele takrat se je pokazalo, kakšen škodljiv vpliv ima dolgotrajnejša izpostavljenost temu patogenemu dejavniku na zdravje ljudi. Azbest namreč preko mehanizma nastanka radikalov in aktivacije vnetnih celic, kot so npr. alveolarni makrofagi in nevtrofilci, povzroča hude poškodbe DNA. Po klasifikaciji Mednarodne agencije za raziskave raka (IARC; angl. International agency for research of cancer) sodi azbest v skupino 1, kar pomeni, da gre za znani človeški karcinogen.

Pri nastanku azbestoze naj bi imeli določeno vlogo tudi genski polimorfizmi različnih encimskih sistemov, predvsem različnih oblik encimov GST.

V okviru magistrske naloge smo zato ugotavljali ali genetske značilnosti posameznika, kot je npr. prisotnost genskega polimorfizma GSTM1 in/ali GSTT1, vplivajo na nastanek azbestoze. Zanimalo nas je predvsem, zakaj nekateri ljudje, ki so bili izpostavljeni azbestu, zbolijo za azbestozo, medtem ko se pri drugih razvijejo plevralni plaki, to je blažja oblika bolezni, ki za razliko od azbestoze, praviloma ne napreduje v raka pljuč.

Ko smo primerjali rezultate prisotnosti oz. odsotnosti genskih polimorfizmov GSTT1 in GSTM1 med skupinama bolnikov z azbestozo in tistih s plevralnimi plaki, smo ugotovili, da:

- med skupinama ni bilo statistično pomembnih razlik v pojavnosti genskega polimorfizma GSTT1 ($p = 0,252$);
- med skupinama ni bilo statistično pomembnih razlik v pojavnosti genskega polimorfizma GSTM1 ($p = 0,183$).

Ko smo primerjali rezultate prisotnosti oz. odsotnosti genskih polimorfizmov GSTT1 in GSTM1 med skupinama bolnikov z azbestozo z zdravimi posamezniki, smo ugotovili, da:

- med skupinama ni bilo statistično pomembnih razlik v pojavnosti genskega polimorfizma GSTT1 ($p = 0,587$);
- med skupinama ni bilo statistično pomembnih razlik v pojavnosti genskega polimorfizma GSTM1 ($p = 0,615$).

Tako nismo mogli potrditi genetskega vpliva polimorfizmov GSTT1 in GSTM1 na pojav azbestoze.

Glede na rezultate primerjav med skupinami bolnikov z azbestozo in zdravimi posamezniki, ki so jih izvedli pred nami in jih objavili v strokovni literaturi, smo sklepali, da so bili genetski vplivi polimorfizmov metabolnih genov GSTM1 in GSTT1 na pojav azbestoze že

potrjeni. Kljub temu pa v naši raziskavi tega nismo uspeli dokazati. Bistvena razlika med našo raziskavo in predhodno izvedenimi raziskavami, je v tem, da so bile slednje izvedene na bistveno večjem številu vzorcev preiskovancev, kar seveda lahko pomembno vpliva na izid statistične analize. Zato sklepamo, da bi statistično značilne razlike v prisotnosti genskih polimorfizmov GSTM1 in GSTT1 v primerjanih skupinah bolnikov z azbestozo in bolnikov s plevralnimi plaki verjetno lahko dokazali, če bi imeli na voljo bistveno večje število preiskovancev, kot pa smo ga imeli na razpolago. Pomembna je tudi ugotovitev, da je bila populacija bolnikov, ki je sestavljala skupino z azbestozo najstarejša (povprečna starost 63 let, standardni odklon 9,2%). Iz tega bi lahko sklepali, da je starost dejavnik tveganja za nastanek te bolezni, možno pa je tudi, da je razlog za njen pojav v tej starostni skupini tudi daljša latentna doba.

Glede na rezultate dosedanjih študij, v okviru katerih so obravnavali vplive polimorfizmov različnih metabolnih genov GST na pojav azbestoze in kjer so ugotovili statistično značilne povezave, lahko sklepamo, da genska predispozicija posameznika igra določeno vlogo pri nastanku te bolezni. Tako očitno čas prve izpostavljenosti azbestu ter njeno trajanje nista edina oz. ključna dejavnika za nastanek azbestoze.

V prihodnosti bi bilo zato smiselno izvesti raziskave in primerjave genskih polimorfizmov GSTM1 in GSTT1 na dovolj velikih vzorcih oseb, ki so zboleli za azbestozo in tistih, pri katerih so se pojavili plevralni plaki, hkrati pa pri omenjenima skupinama primerjati tudi prisotnost genskih polimorfizmov GSTP1.

6 LITERATURA

- (1) David W. Kamp, Asbestos-induced lung diseases, Translational research, Volume 153, 2009; 4: 143-150
- (2) <http://www.mesothelioma.com/asbestos-cancer/what-is-asbestos.htm> (03.02.2016)
- (3) Vpliv polimorfizmov metabolnih genov na tveganje za razvoj azbestoze = The influence of metabolic gene polymorphisms on the risk of developing abestosis / Doktorsko delo / Alenka Franko, Ljubljana, april 2010
- (4) David W. Kamp, Sigmund A. Weitzman; The molecular basis of asbestos induced lung injury, Thorax, 1999, 54: 638-652
- (5) <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=30&tid=4> (17.01.2017)
- (6) P. A. Gevenois, V. de Maertelaer, A. Madani, C. Winant, G. Sergent, P. De Vujst; Abestosis, pleural plaques and diffuse pleural thickening: three distinct benign responses to asbestos exposure, European respiratory journal, 1998; 11: 1021 – 1027
- (7) C. B. Manning, V. Vallyathan, B. T. Mossman; Diseases caused by asbestos: mechanism of injury and disease development, International Immunopharmacology, 2002, 2: 191-200
- (8) B. Fubini, A. Hubbard; Reactive oxygen species (ROS) and Reactive nitrogen species (RNS) generated by silica in inflammation and fibrosis; Free Radical Biology and Medicine, Volume 34, 2003, 12: 1507-1516
- (9) <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/asbestosis/basics/definition/con-20019671> (22.02.2016)
- (10) <http://www.asbestos.com/mesothelioma/pleural-plaques.php> (12.05.2016)
- (11) <http://www.asbestos.com/mesothelioma/pleural-effusion.php> (11.05.2016)

- (12) <http://www.cancercenter.com/lung-cancer/symptoms/> (18.05.2016)
- (13) <http://www.asbestos.com/mesothelioma/pleural.php> (11.05.2016)
- (14) A. Franko, V. Dolžan, N. Arnerić, M. Dodoč-Fikfak; The influence of gene-gene and gene-environmental interactions on the risk of asbestosis; *Bio Med Research International*, Volume 2013, 2013,405743: 1-7
- (15) D. Sheehan, V. M. Foley, C.A: Dowd; Structure, function and evolution of glutathione S-transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily; *Biochem J.*, 2001, 360: 1-16
- (16) A. Franko, M. Dodič-Fikfak, N. Arnerić; Glutathione S-transferases GSTM1 and GSTT1 polymorphism and asbestosis; *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2007, 49: 667-671
- (17) S. Pečar, J. Mravljak; Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu; Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 18-19
- (18) S. Singh; Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death; *Cancer Chemother Pharmacol*; 2015, 75 (1): 1-15
- (19) D. M. Townsend, K. D Tew; The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance; *Oncogene*, 2003, 22: 7369-7375
- (20) G. Ginsberg, S. Smolenski, D. Hattis, K. Z. Guyton, D. O. Johns, B. Sonawane; Genetic polymorphism in GST: Population distribution of GSTM1, T1 and P1 conjugating activity, *Journal of toxicology and environmental health*, 2009, 12: 389-439
- (21) A. Franko, V. Dolžan, N. Arnerić, M. Dodič-Fikfak; The influence of genetic polymorphisms of GSTP1 on the development of asbestosis, *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, Volume 50, 2008; 1: 7-12

- (22) D. Černe, B. Ostanek; Biomedicinska analitika 1, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012: 108-139
- (23) <http://www2.arnes.si/~mpavle1/mp/stat.html> (01.09.2016)
- (24) <https://www.fsd.uni-lj.si/mma/12-Hi-kvadrat/2010041914015611> (01.09.2016)
- (25) C. M. Smith, K. T. Kelsey, J. K. Wiencke, K. Leyden, S. Levin D. C. Christiani; Inherited glutathione-S-transferase deficiency is a risk factor for pulmonary asbestosis, Cancer Epidemiology, Biomarkers and prevention, Volume 3, 1994, 6: 471-477
- (26) A. Franko, M. Dodič-Fikfak, N. Arnerić V. Dolžan; Manganese and extracellular superoxide dismutase polymorphisms and risk for asbestosis; Journal of Biomedicine and Biotechnology, Volume 2009, 2009: 1-6