

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA SETNIKAR

DIPLOMSKA NALOGA

**PREUČEVANJE IZRAŽANJA GENA ZA SINTAZO VIŠJIH
MAŠČOBNIH KISLIN V NEDROBNOCELIČNEM
PLJUČNEM RAKAVEM TKIVU**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA SETNIKAR

DIPLOMSKA NALOGA

**PREUČEVANJE IZRAŽANJA GENA ZA SINTAZO VIŠJIH
MAŠČOBNIH KISLIN V NEDROBNOCELIČNEM
PLJUČNEM RAKAVEM TKIVU**

**STUDY OF FATTY ACID SYNTHASE GENE EXPRESSION
IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER TISSUE**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo (Katedra za klinično biokemijo) pod mentorstvom izr. prof. dr. Darka Černeta. Vse meritve sem opravila v laboratorijih Fakultete za farmacijo.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Darku Černetu za strokovno pomoč, trud in dragocene nasvete. Prav tako se zahvaljujem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za pomoč in prijaznost pri delu v laboratoriju.

Posebno se zahvaljujem staršem, ki so mi omogočili študij in me pri tem podpirali.

Zahvaljujem se tudi vsem prijateljem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku te diplomske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Darka Černeta, mag. farm., spec. med. biokem.

Tina Setnikar

Ljubljana, oktober 2010

KAZALO

KAZALO	4
KAZALO SLIK	6
KAZALO PREGLEDNIC	7
POVZETEK	8
ABSTRACT	9
SEZNAM OKRAJŠAV	10
1 UVOD	11
1.1 Pljučni rak.....	11
1.1.1 Epidemiologija pljučnega raka.....	11
1.1.2 Etiologija in dejavniki tveganja pljučnega raka	11
1.1.3 Histološka razvrstitev in patološke značilnosti pljučnih tumorjev.....	12
1.1.4 TNM klasifikacija.....	14
1.2 Mehanizmi preskrbe rakavega tkiva z višjimi maščobnimi kislinami	16
1.2.1 Eksogeni mehanizmi preskrbe z višjimi maščobnimi kislinami	17
1.2.1.1 Lipoproteinska lipaza.....	17
1.2.1.2 Apolipoprotein E.....	17
1.2.1.3 LDL receptor	17
1.2.1.4 Receptorji čistilci	18
1.2.2 Endogeni mehanizmi preskrbe z višjimi maščobnimi kislinami.....	18
1.2.2.1 ATP citrat liaza	18
1.2.2.2 Acil-CoA sintetaza.....	19
1.2.2.3 Spot 14	19
1.2.2.4 Sintaza višjih maščobnih kislin	19
1.3 Sintaza višjih maščobnih kislin.....	20
1.3.1 Struktura.....	20
1.3.2 Vloga FASN v <i>de novo</i> sintezi maščobnih kislin.....	22
1.3.3 Uravnavanje izražanja FASN.....	23
1.3.4 FASN kot tarča protitumornih učinkovin	25
1.3.4.1 Zaviralci FASN.....	25
1.3.4.2 Citotoksični mehanizmi zaviranja FASN.....	27
2 NAMEN DELA	29

3	MATERIALI IN METODE	30
3.1	Vzorci	30
3.2	Materiali in aparature.....	30
3.3	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času.....	31
3.3.1	Princip metode.....	31
3.3.2	Potek reakcije PCR v realnem času.....	35
3.3.3	Analiza rezultatov	36
3.4	Zanesljivost postopka in priporočila	37
3.5	Uporabljene statistične analize.....	37
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	38
4.1	Klinični podatki o bolnikih	38
4.2	Rezultati meritev izražanja gena <i>FASN</i>	40
4.2.1	Izražanje gena <i>FASN</i> v tumorskem in kontrolnem tkivu	41
4.2.2	Korelacija med izražanjem gena v tumorskem in kontrolnem tkivu.....	44
4.2.3	Izražanje gena <i>FASN</i> v različnih stadijih bolezni.....	44
4.2.4	Izražanje gena <i>FASN</i> v različnih histoloških tipih.....	47
4.2.5	Izražanje gena <i>FASN</i> in izguba telesne teže.....	48
4.2.6	Izražanje gena <i>FASN</i> in kajenje.....	48
4.2.7	Izražanje gena <i>FASN</i> in preživetje.....	49
4.2.8	Prognostičen pomen izražanja gena <i>FASN</i> v tumorskem tkivu	51
4.2.9	Izražanje gena <i>FASN</i> in lipoproteinska lipaza.....	52
5	SKLEP	53
6	LITERATURA	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Histološki tipi pljučnega raka.	13
Slika 2: Položaj gena <i>FASN</i> na kromosomu 17.	20
Slika 3: Prikaz organizacije katalitičnih aktivnosti na encimu <i>FASN</i>	20
Slika 4: 3D struktura <i>FASN</i>	21
Slika 5: Presnova glukoze in <i>de novo</i> sinteza višjih maščobnih kislin v rakavih celicah.	23
Slika 6: Molekularni mehanizmi uravnavanja izražanja <i>FASN</i> v rakavi celici.	24
Slika 7: Strukture in mesto delovanja zaviralcev <i>FASN</i>	26
Slika 8: Citotoksični mehanizmi zaviranja <i>FASN</i>	28
Slika 9: Prikaz krivulje jakosti fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri PCR v realnem času	32
Slika 10: Princip delovanja PCR v realnem času s sondo TaqMan	33
Slika 11: Statistična analiza izražanja gena <i>FASN</i> v tumorskem in kontrolnem tkivu.	43
Slika 12: Statistična analiza izražanja gena <i>FASN</i> v različnih stadijih tumorskega tkiva.	45
Slika 13: Statistična analiza izražanja gena <i>FASN</i> v različnih stadijih kontrolnega tkiva.	46
Slika 14: Statistična analiza izražanja gena <i>FASN</i> v kontrolnem tkivu živih in pokojnih bolnikov 4 leta po operaciji.	50

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Značilnosti histoloških tipov pljučnih rakov	13
Preglednica II: Določanje razširjenosti (stadija) bolezni po sistemu TNM	14
Preglednica III: Klinične značilnosti in laboratorijski rezultati bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom.	38
Preglednica IV: Rezultati meritev Ct tarčnega gena <i>FASN</i> , hišnega gena <i>GUS</i> , normalizacija <i>FASN</i> , relativno izražanje <i>FASN</i> ter razmerje <i>FASN</i> v kontrolnem in tumorskem tkivu	40
Preglednica V: Deskriptivna statistika izražanja gena <i>FASN</i> v tkivu.	42
Preglednica VI: Deskriptivna statistika izražanja gena <i>FASN</i> v tumorskem tkivu glede na stadij bolezni.	44
Preglednica VII: Deskriptivna statistika izražanja gena <i>FASN</i> v kontrolnem tkivu glede na stadij bolezni.	46
Preglednica VIII: Deskriptivna statistika izražanja gena <i>FASN</i> v tumorskem tkivu glede na histološki tip.	47
Preglednica IX: Deskriptivna statistika izražanja gena <i>FASN</i> v tumorskem tkivu glede na izgubo telesne teže.	48
Preglednica X: Deskriptivna statistika izražanja gena <i>FASN</i> v tumorskem tkivu glede na kajenje.	49
Preglednica XI: Deskriptivna statistika izražanja gena <i>FASN</i> v tumorskem tkivu pri živih in pokojnih bolnikih.	49
Preglednica XII: Deskriptivna statistika izražanja gena <i>FASN</i> v kontrolnem tkivu pri živih in pokojnih bolnikih.	50

POVZETEK

Sintaza višjih maščobnih kislin je večfunkcionalen encim, ki ga kodira gen *FASN*. Od vseh lipogenih encimov v sintezni poti višjih maščobnih kislin ponuja najboljšo možnost tarčnega zdravljenja v terapiji tumorjev, saj je edini encim sesalcev sposoben *de novo* sinteze maščobnih kislin in njegova prisotnost je zvečana v večini človeških karcinomov.

V okviru diplomske naloge smo preučevali izražanje *FASN* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu in sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika. Glede na literaturne podatke o imunohistokemičnih določitvah proteina *FASN* v rakavih tkivih smo predvidevali, da je izražanje gena *FASN* višje v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu kot v kontrolnem tkivu istega bolnika in da je izražanje gena *FASN* povezano vsaj s katerim od opazovanih kliničnih podatkov bolnikov (stadij bolezni, histološki tip tumorja, starost, spol, izguba telesne teže bolnikov pred operacijo, število let kajenja, 4-letno preživetje bolnikov).

Z uporabo metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času smo izmerili izražanje gena *FASN* v tumorskem in v sosednjem netumorskem tkivu 42 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Izražanje gena *FASN* je bilo v nasprotju z našimi pričakovanji 1,83-krat večje v kontrolnem tkivu kot v rakavem tkivu (mediana 5,92 proti mediana 3,23; $p = 0,0045$). Izražanje gena *FASN* v rakavem in v kontrolnem tkivu ni bilo povezano z nobenim od opazovanih kliničnih podatkov bolnikov ter ni imelo prognostičnega pomena. Ugotovili pa smo, da je izražanje gena *FASN* v kontrolnem tkivu koreliralo z aktivnostjo lipoproteinske lipaze v kontrolnem tkivu ($p = 0,0152$) ter z izražanjem gena za LPL v kontrolnem tkivu ($p = 0,0295$).

Rezultate naše raziskave je težko primerjati z rezultati predhodnih raziskav, v katerih je bil *FASN* izmerjen skoraj izključno imunohistokemično in zaradi razlik v zasnovi raziskav.

Poleg izražanja gena *FASN* bi bilo v prihodnosti smiselno izmeriti tudi aktivnost encima v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem in v kontrolnem tkivu, saj bi tako lažje razumeli vlogo encima pri preskrbi rakavega tkiva z energijo in sintezni prekursorji nujnimi za rast in razvoj rakavega tkiva.

ABSTRACT

Fatty acid synthase is complex multifunctional enzyme encoded by the *FASN* gene. It offers the best chance for target therapy of all lipogenic enzymes in fatty acid synthesis, because it is the sole mammalian enzyme capable of *de novo* fatty acid synthesis and its presence is increased in most human carcinomas.

We studied the expression of *FASN* in non-small cell lung cancer tissue and adjacent apparently healthy lung tissue of the same patient. According to literature data on immunohistochemical determinations of FASN protein in cancer tissues, we assumed that *FASN* gene expression is higher in non-small cell lung cancer tissue than in control tissue of the same patient and that *FASN* gene expression is associated at least with some of the observed clinical data of patients (stage of disease, tumor histological type, age, sex, weight loss of patients before surgery, smoking index, 4-year survival of patients).

By using the technique of real-time polymerase chain reaction we measured gene expression in the cancer and in the adjacent non-cancer tissue of 42 patients with non-small cell lung cancer. *FASN* gene expression was 1,83 times higher in the control tissue than in the cancer tissue (median 5,92 vs. median 3,23; $p = 0,0045$). *FASN* gene expression in cancer and in control tissue was not associated with any of the observed clinical data and had no predictive value. We found that expression of *FASN* gene in control tissue did correlate with the activity of lipoprotein lipase in control tissue ($p = 0,0152$) and with *LPL* gene expression in control tissue ($p = 0,0295$).

Results of our study are difficult to compare with results of previous studies, in which FASN was measured almost exclusively immunohistochemically and because of differences in design research.

Besides *FASN* gene expression in the future would be reasonable to measure the activity of enzyme in non-small cell lung cancer and in control tissues, because than it would be easier to understand the role of the enzyme in supplying cancer tissue with energy and synthesizing precursors essential for growth and development of cancer tissue.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACC	acetil-CoA karboksilaza
ACLY	ATP citrat liaza
ACS	acil-CoA sintetaza
Apo E	apolipoprotein E
BMI	indeks telesne mase (ang. body mass index)
CoA	koencim A
CPT-1	karnitin palmitoiltransferaza I
Ct	cikel qPCR, kjer fluorescenca preseže nastavljeni prag
cDNA	komplementarna DNA
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EGFR	receptor za epidermalni rastni dejavnik
FASN	sintaza višjih maščobnih kislin
<i>FASN</i>	gen, ki kodira sintazo višjih maščobnih kislin
GUS	β -glukuronidaza
LDL	lipoprotein nizke gostote
LPL	lipoproteinska lipaza
MAPK	mitogen-aktivirana protein kinaza
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF κ B	jedrni dejavnik κ B
NSCLC	nedrobnocelični pljučni rak (ang. non-small cell lung cancer)
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (ang. quantitative polymerase chain reaction)
SD	standardna deviacija
SREBP-1c	od sterola odvisen regulatorni element vezoči protein 1c (ang. sterol regulatory element binding protein-1c)
TNM	tumor, bezgavke, metastaze (ang. tumor, lymph nodes, metastases)
USP2a	ubikvitin-specifična proteaza-2a
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (ang. World health organization)

1 UVOD

1.1 Pljučni rak

1.1.1 Epidemiologija pljučnega raka

Pljučni rak je najpogostejša rakava bolezen v svetu, v Evropi in v Sloveniji. Predstavlja 19 % vsega raka pri moških in 5 % pri ženskah. Relativno petletno preživetje znaša samo 8-10 % (1). Po podatkih svetovne zdravstvene organizacije (WHO) zaradi pljučnega raka vsako leto umre 1,3 milijona ljudi na svetu (2). V letu 2007 je bilo v Sloveniji odkritih 1216 ljudi s pljučnim rakom (3).

1.1.2 Etiologija in dejavniki tveganja pljučnega raka

Kancerogeneza pljučnega raka je večstopenjski proces, ki je posledica zunanjih in notranjih dejavnikov. Med zunanjimi je najpomembnejše dolgotrajno kajenje, ki je vzrok za nastanek raka pri 90 % moških in 78 % žensk. V tobačnem dimu so dokazali več kot 1200 različnih snovi, med katerimi je vsaj 60 kancerogenih. Med pomembnejšimi so policiklični aromatski ogljikovodiki kot sprožilci kancerogeneze (npr. benzapiren, dibenzantracen), ki povzročijo mutacije in s tem trajno okvaro DNA, promotorji kancerogeneze (npr. derivati fenola) ter nitrozamini. Pomembna sta čas kajenja in število pokajenih cigaret. Po oceni WHO na svetu kadi 47 % moških in 12 % žensk nad 15 let starosti. Ni znano, zakaj se rak razvije le pri 10-20 % kadilcev. To kaže tudi na druge, predvsem notranje vzročne dejavnike. Po latentni dobi 20-25 let kadilci zbolijo od 10- do 20-krat pogosteje, pasivni kadilci pa do 2-krat pogosteje kot nekadilci.

Poleg kajenja je nevarna poklicna izpostavljenost kancerogenim dejavnikom, kot so azbest, težke kovine in njihove spojine ter druge kemične spojine: nikelj, berilij, svinec, kadmij, baker, krom, arzen, policiklični ogljikovodiki, vinilklorid, biklorometileter ter vse vrste sevanja kot tudi sevanje v rudnikih urana.

Učinki navedenih dejavnikov se lahko seštevajo ali celo množijo (kar velja za azbest in kajenje, kjer je dejavnik tveganja preko 50). Le 1-3 % pljučnega raka naj bi nastalo zaradi nepoklicne izpostavljenosti onesnaženemu zraku. Pomembna je izpostavljenost radonu in njegovim razpadnim produktom v zaprtih, dobro zatesnjenih in nezračenih prostorih.

Omenjajo tudi vpliv hormonov, raznih zdravil, hrano z obilnimi maščobami, virusne okužbe (adenovirusi, papiloma virusi).

Med notranjimi vzroki so pomembne kronične pljučne bolezni z žariščnim ali razširjenim brazgotinjenjem pljuč, kot na primer kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB), pljučne fibroze, tuberkuloza.

Pomembna je presnova kancerogenov, njihovo izločanje ali pretvorba v aktivno obliko. Strastni kadilci, ki ne zbolijo za pljučnim rakom, verjetno niso sposobni presnavljati kancerogenov v delujoče oblike.

Med najpomembnejšimi notranjimi dejavniki sta aktivacija dominantnih (proto)onkogenov in zaviranje recesivnih onkogenov (antionkogenov oz. tumor zaviralnih – supresorskih genov).

Kancerogeneza je v bistvu bolezen celičnega cikla in je posledica akumulacije več genskih oz. molekularnih sprememb na recesivnih in dominantnih genih, ki jih povzročajo različni zunanji ali notranji dejavniki (4, 5).

1.1.3 Histološka razvrstitev in patološke značilnosti pljučnih tumorjev

Dve glavni obliki pljučnega raka, ki jih potrdimo na osnovi citološke in/ali histološke preiskave odvzetih tumorskih celic in tkiv sta **drobnocelični** (15-25 %) in **nedrobnocelični** (75-85 %) rak pljuč. Imeni ne opisujeta velikosti tumorja ampak govorita o obliki in velikosti celic, ki sestavljajo tumor in so vidne s pomočjo mikroskopske preiskave rakavih celic in tkiva.

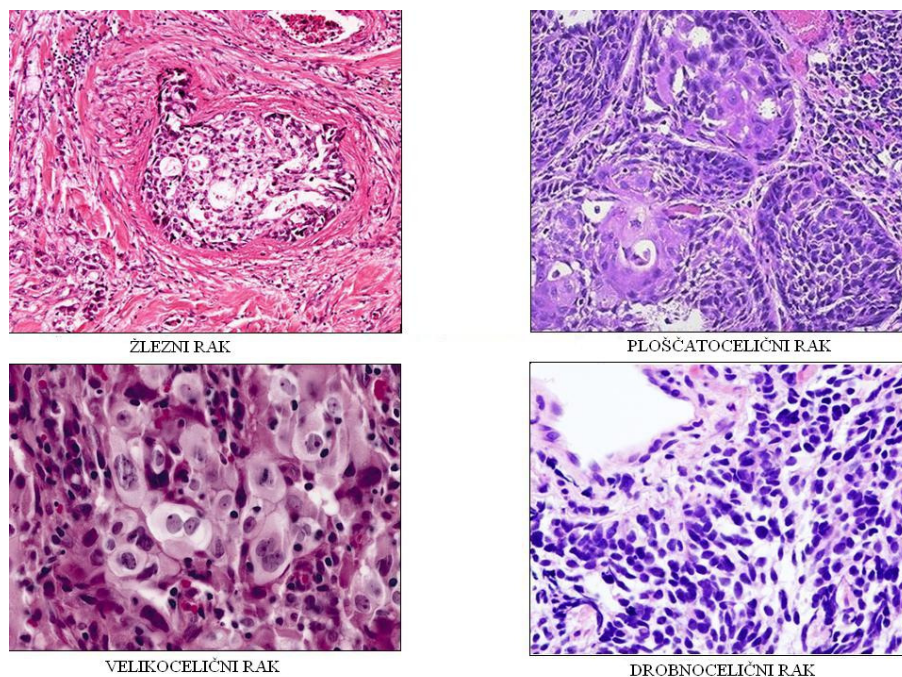
Drobnocelični rak je znan po hitri rasti z zelo zgodnjimi zasevki po telesu. Primarni tumor je pogosto zelo majhen in po dolgotrajnem kajenju vznikne v glavnih dihalnih poteh. Zdravimo ga s kemoterapijo in obsevanjem.

Najpogostejša oblika raka na pljučih je nedrobnocelični rak pljuč (non-small cell lung cancer – NSCLC). Takšno obliko raka ima preko 75 % vseh bolnikov s pljučnim rakom. Glede na citološko in histološko sliko delimo nedrobnocelični rak pljuč na naslednje oblike:

- ploščatocelični rak ali karcinom skvamoznih celic (največkrat se razvije v osrednjem delu pljuč, kot posledica kajenja),
- žlezni rak ali adenokarcinom (največkrat zraste na periferiji pljuč, histološko ga prepoznamo po oblikovanih žlezah in/ali zaradi mucinogeneze – izločanja sluzi),
- velikocelični rak ali makrocelularni karcinom (najpogosteje ga odkrijemo kot relativno veliko spremembo v obrobem predelu pljuč).

Izgled histoloških tipov prikazuje slika 1, njihove značilnosti pa preglednica I.

Klasifikacija tumorjev na celični tip je včasih težka, saj so tumorji pogosto mešani. Ker se drobnocelični in nedrobnocelični zelo različno obnašajo, je zdravljenje različno. Prve zdravimo predvsem s kemoterapijo in obsevanjem, druge, ki dlje časa ostajajo lokalizirani, pa kirurško. Ostali, manj pogosti tumorji v pljučih so še: karcinoid, limfom, adenom, bronhioloalveolarni karcinom, ki je oblika žleznega raka, hamartom, sarkom in ne nazadnje metastaze primarnih tumorjev od drugod (4, 6).



Slika 1: Histološki tipi pljučnega raka (7).

Preglednica I: Značilnosti histoloških tipov pljučnih rakov (8).

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

1.1.4 TNM klasifikacija

Razširjenost (zamejenost) oz. stadij bolezni je najpomembnejši napovedni dejavnik. Določamo jo s pomočjo TNM klasifikacije, kjer stopnje T 1 – 4 pomenijo različno velikost tumorja in način rasti v okolico, oznake NX, 0, 1, 2 povedo o morebitnih zasevkih v področne in oddaljene bezgavke, oznake MX, 0, 1 pa o zasevkih v parenhimske organe. Kombinacija TNM elementov predstavlja določen stadij (4). Podrobna razvrstitev stopenj in stadija bolezni je prikazana v preglednici II.

Preglednica II: Določanje razširjenosti (stadija) bolezni po sistemu TNM (4, 9).

T (primarni tumor)	
TX	Primarnega tumorja z bronhoskopskimi in slikovnimi metodami ne moremo dokazati, rakave celice so prisotne v sputumu ali bronhialnem izpirku.
T0	Ni znakov primarnega tumorja.
Tis	Karcinom in situ.
T1	Bronhialni tumor v lobarnem bronhiju, manjši od 3 cm.
T2	Tumor večji od 3 cm, ali raste v glavnem bronhiju vsaj 2 cm distalno od glavne karine, ali raste v visceralno plevro, ali povzroča atelektazo oz. obstruktivski pnevmonitis dela pljuč.
T3	Tumor, ki ne glede na velikost raste v steno prsne votline, mediastinalno, perikardialno, diafragmalno plevro, ali je v glavnem bronhiju manj kot 2 cm od glavne karine, ali povezan s pnevmonitisom oz. atelektazo celih pljuč.
T4	Tumor, ki ne glede na velikost raste v okolne organe (mediastinum, srce, velike žile, sapnik, požiralnik, hrbtenico, v glavno karino), ali zaseva v isti pljučni reženj, ali povzroča maligni plevralni izliv.

N (bezgavke)

NX	Ocena lokalnih bezgavk ni mogoča.
N0	Ni tumorskih zasevkov v lokalnih bezgavkah.
N1	Zasevki v intrapulmonalne (vključno z direktnim širjenjem tumorja), lobarne, hilusne bezgavke na strani tumorja.
N2	Zasevanje v istostranske mediastinalne ali subkarinalne bezgavke.
N3	Zasevanje v hilusne, mediastinalne bezgavke nasprotne strani ali v bezgavke vratne skalenske mišice ali supraklavikularne bezgavke na isti ali drugi strani pljuč.

M (oddaljeni zasevki)

MX	Oddaljenih zasevkov ne moremo opredeliti.
M0	Oddaljenih zasevkov ni.
M1	Zasevki v parenhimske organe ali zasevek pljučnega tumorja v drugi pljučni reženj.

Stadiji pljučnega raka

Okultni (prikriti)	TX, N0, M0
Stadij 0	Tis, N0, M0
Stadij IA	T1, N0, M0
Stadij IB	T2, N0, M0
Stadij IIA	T1, N1, M0
Stadij IIB	T2, N1, M0, ali T3, N0, M0
Stadij IIIA	T1, N2, M0, ali T2, N2, M0, ali T3, N1, M0, ali T3, N2, M0
Stadij IIIB	Katerikoli T, N3, M0, ali T4, katerikoli N, M0
Stadij IV	Katerikoli T, katerikoli N, M1

Stopnje preživetja v vsaki fazi se razlikujejo. Celokupno preživetje bolnikov s pljučnim rakom je manj kot 15 %. Vendar pa je lahko nad 80 % bolnikov v zelo zgodnji fazi (T1, N0) pljučnega raka ozdravljeno s kirurško resekcijo. V II. stadiju bolezni pade 5-letna stopnja preživetja na 40 % in v stadiju IIIA znaša le še 10-40 %. Samo nekateri bolniki s stadijem IIIB in IV (samotni zasevki) so lahko ozdravljeni s kirurško resekcijo (10).

1.2 Mehanizmi preskrbe rakavega tkiva z višjimi maščobnimi kislinami

Za vzpostavitev učinkovite strategije v farmakološki terapiji raka je bistvenega pomena opredelitev značilnosti bolezni in odkritje načinov za izbiro selektivne tarče. Spremenjena presnova je ena od pomembnih značilnosti raka. Otto Warburg je v 20ih letih 20. stoletja prvi opazil povečano anaerobno glikolizo pri raku. Zvišan glukozni katabolizem ustvarja presežek glikolitičnega končnega produkta, piruvata. Večina piruvata se pretvori v laktat, nekaj laktata pa se nato dalje pretvori v acetil-CoA, ki se uporablja pri *de novo* sintezi maščobnih kislin. Hitro deleče rakave celice potrebujejo *de novo* sintezo maščobnih kislin za nenehno preskrbo z lipidi in za izgradnjo membrane. Sintetizirane maščobne kisline se uporabljajo tudi za proizvodnjo energije s pomočjo β -oksidacije in za lipidno modifikacijo beljakovin. Večina normalnih človeških tkiv za tovrstne potrebe prednostno uporablja lipide iz prehrane (eksogene), kajti *de novo* (endogena) sinteza maščobnih kislin je običajno zavrta in izražanje *FASN* (gen, ki kodira sintazo višjih maščobnih kislin – *FASN*) je na nizki ravni. Nasprotno pa je v rakavih celicah *de novo* sinteza maščobnih kislin običajno zvišana in celična preskrba z maščobnimi kislinami je od nje zelo odvisna (11, 12).

Čeprav se poti, ki vodijo do izboljšane preskrbe tumorskih celic z višjimi maščobnimi kislinami, razlikujejo od tistih v netumorskih celicah, pa so mehanizmi preskrbe v večini primerov enaki: s sintezo, v kateri so udeleženi različni encimi (*FASN*, lipoproteinska lipaza) ali s pomočjo membranskih receptorjev (LDL receptor, receptorji čistilci). Zvečano izražanje genov, zvišane aktivnosti encimov in večje število membranskih receptorjev so nekateri izmed dejavnikov, ki ločujejo tumorske celice od netumorskih in jih izkoriščamo v diagnostiki, prognozi in tudi terapiji rakavih obolenj (12).

1.2.1 Eksogeni mehanizmi preskrbe z višjimi maščobnimi kislinami

1.2.1.1 Lipoproteinska lipaza

Lipoproteinska lipaza (LPL) je pglavitni encim znotrajžilne presnove trigliceridov. Sintetizira se v parenhimskih celicah mnogih tkiv, od kjer se prenese na površino endotelija. Fiziološka aktivnost LPL je hidroliza trigliceridnih preostankov na lipoproteinih, bogatih s trigliceridi (hilomikroni in VLDL) ter sposobnost interagiranja z lipoproteini neodvisno od njegove lipolizne aktivnosti, kar omogoči encimu, da veže lipoproteine na steno žilja. Prav tako vpliva na selektiven privzem lipofilnih vitaminov (A, E) brez hkratnega privzema ostalih sestavin lipoproteina (13).

Tkivno specifično uravnavanje sinteze in s tem aktivnosti LPL v tkivu omogoča tkivom z velikimi presnovnimi potrebami učinkovito črpanje maščob iz krvi. Nekatere raziskave nakazujejo povezavo med LPL in rastjo rakavega tkiva (14).

1.2.1.2 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (apo E) je sestavni del lipoproteinov, bogatih s trigliceridi. Veže se na specifične receptorje v jetrih in perifernih celicah, ter prenaša lipoproteine, maščobotopne vitamine in holesterol v kri in limfni sistem. Celice sproščajo apo E v kri, kjer obogati lipoproteine (LDL, VLDL, IDL), ki se nato lažje vežejo na različne receptorje (LDL receptor, VLDL receptor). Tako tkivo dobi več maščob in ima s tem boljšo možnost obnavljanja in rasti. Nenormalnost v delovanju apo E povezujemo s hiperlipoproteinemijo tipa III, aterosklerozo in Alzheimerjevo boleznijo.

Raziskave v zadnjem času kažejo na povišano izražanje gena za apo E pri raku pljuč, raku na jajčnikih, prostati, debelem črevesu, dojki in pankreasu. Vendar pa po doslej znanih podatkih visoko izražanje apo E ni dokazano povezano s stadijem raka, histološkim tipom tumorja ali preživetjem bolnika (15).

1.2.1.3 LDL receptor

Receptor za lipoprotein nizke gostote je transmembranski protein, ki posreduje pri endocitozi s holesterolom bogatega LDL. Izražanje LDL receptorja je v normalnih tkivih regulirano preko negativne povratne zanke z LDL. Pri tumorskem tkivu pa je ta zanka okvarjena. Okvarjeno uravnavanje omogoča tumorskim celicam privzem velikih količin

maščobnih kislin, kar omogoči preskrbo celic z dodatnim virom energije ter strukturnimi molekulami za pospeševanje nekontrolirane rasti tumorjev.

Zvišano izražanje LDL receptorjev je potencialna tarča protitumornih učinkovin, saj bi se te učinkovine zaradi razlik v izražanju receptorjev pri tumorskih in normalnih celicah specifično in bolj učinkovito vezale na tumorske celice (16).

1.2.1.4 Receptorji čistilci

Receptorji čistilci so velika skupina strukturno različnih molekul, ki so vpletene v niz funkcij. Na podlagi njihove strukture, so razvrščeni v osem različnih razredov (razred A, B, C, D, E, F, G in H), v skladu s klasifikacijo, ki jo predlaga Krieger in sodelavci (17). Izražajo jih mieloidne celice, izbrane endotelijske celice in nekaj epitelnih celic. Prepoznajo različne ligande, vključno z mikrobiološkimi patogeni, kot tudi endogene in pridobljene molekule (18).

Receptorji čistilci, predvsem makrofagni receptor čistilec tipa A, vežejo spremenjen LDL, kot je acetiliran LDL ali oksidiran LDL. Ker je rak oksidativni stres, je možno zvišano izražanje gena za receptor v tumorskih celicah, kar omogoča večjo vezavo spremenjenega LDL. To pa pomeni boljšo preskrbo tumorskega tkiva s hranilnimi snovmi.

1.2.2 Endogeni mehanizmi preskrbe z višjimi maščobnimi kislinami

1.2.2.1 ATP citrat liaza

Protein ATP citrat liaza (ACLY), ki ga kodira gen *ACLY*, katalizira pretvorbo citrata v citosolni acetyl-CoA, s čimer sodeluje v sintezi maščobnih kislin. Poročali so o zvišanem izražanju in aktivnosti ACLY v rakavih celicah. Zaviranje ACLY vodi do signifikantnega poslabšanja od glukoze odvisne lipidne sinteze. Poleg tega, zaviranje *ACLY* s siRNA ali selektivnim zaviralcem SB-204990 zavira rast in preživetje tumorskih celic *in vitro* in *in vivo*. Čeprav molekularni mehanizmi celične smrti, ki je odvisna od zaviranja ACLY še niso pojasnjeni, dosedanje raziskave nakazujejo, da bi ta encim lahko bil tarča v protitumorni terapiji (11).

1.2.2.2 Acil-CoA sintetaza

Acil-CoA sintetaza (ACS) je encim, ki pretvarja višje maščobne kisline v acil-CoA. Ta reakcija je pomemben korak v mnogih lipidnih presnovnih poteh, vključno z biosintezo fosfolipidov in triacilglicerola, β -oksidacijo in lipidno modifikacijo celičnih proteinov. V sesalcih obstaja pet izooblik ACS (ACSL1, 3, 4, 5 in 6). Študije s specifičnim zaviralcem encima ACS so razkrile, da zaviranje ACS sproži selektivno apoptozo v rakavih celicah po poti posredovani preko mitohondrijev. Ti podatki kažejo, da ACS sodeluje pri preživetju tumorskih celic in da bi bilo zaviranje ACS učinkovita strategija za zdravljenje raka. Trenutno še ni jasno, zaviranje katerega dela ACS bi povzročilo najbolj selektivno tumorsko celično smrt. Za pojasnitev vloge vsake ACS izooblike v normalnih in rakavih celicah so potrebne dodatne raziskave (11).

1.2.2.3 Spot 14

Spot 14 je majhen, kisel jedrni protein, značilen za jetra, maščevje in mlečne žleze med laktacijo. V mlečnih žlezah je odgovoren za proliferacijo epitelija in produkcijo mleka. Ker spot 14 uravnava izražanje encimov za sintezo višjih maščobnih kislin, njegovo zvišano izražanje zagotavlja zvečano sintezo lipidov v tumorjih, kar je značilno za raka na dojki (19).

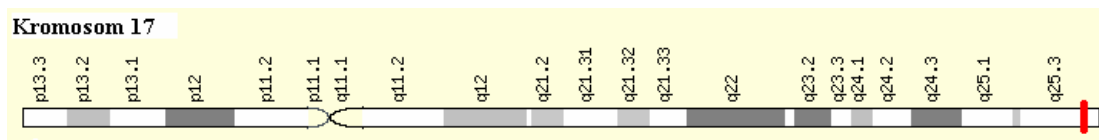
1.2.2.4 Sintaza višjih maščobnih kislin

Maščobne kisline so bistvene sestavine vseh bioloških membran in predstavljajo pomembno obliko shranjevanja energije v živalih in rastlinah, zato se njihova biosinteza pojavlja v vseh živih organizmih. Od vseh lipogenih encimov v sintezni poti višjih maščobnih kislin, FASN ponuja najboljšo možnost tarčnega zdravljenja v terapiji tumorjev, saj je edini encim sesalcev, ki je sposoben *de novo* sinteze maščobnih kislin in njegova prisotnost je zvečana v večini človeških karcinomov (12, 20).

1.3 Sintaza višjih maščobnih kislin

1.3.1 Struktura

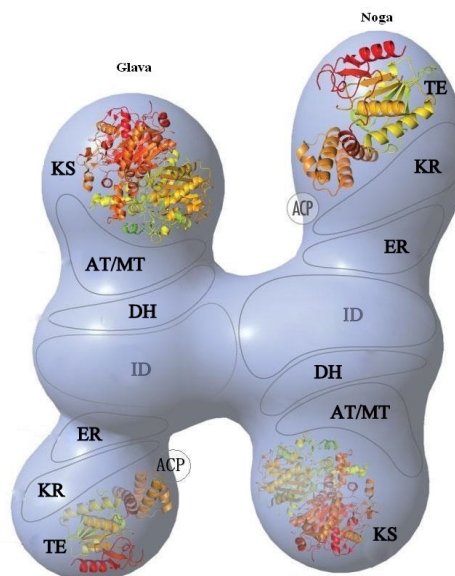
Gen *FASN* se nahaja na kromosomu 17 na lokusu q25.



Slika 2: Položaj gena *FASN* na kromosomu 17 (21).

Človeška sintaza višjih maščobnih kislin je homodimer. Vsaka veriga ima molekularno maso 270 kD. Urejeni sta v antiparalelni konfiguraciji. Ta ureditev ustvarja dva aktivna centra ločena z vmesnim področjem (ID). Sestava dimera je bistvenega pomena za delovanje *FASN*. Organizacija sedmih katalitičnih aktivnosti in proteinskega prenašalca acilne skupine v posamezni polipeptidni verigi od končnega N do končnega C je naslednja:

- β -ketoacil sintaza (KS),
- acetil/malonil transacilaza (AT/MT),
- β -hidroksiacil dehidrataza (DH),
- enoil reduktaza (ER),
- β -ketoacil reduktaza (KR),
- proteinski prenašalec acilne skupine (ACP) in
- tioesteraza (TE).

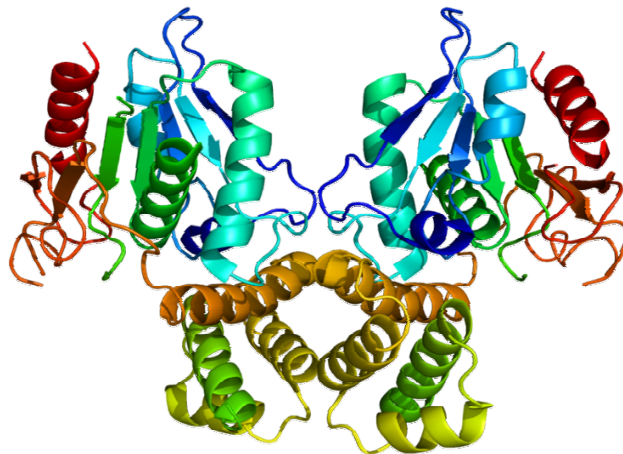


Slika 3: Prikaz organizacije katalitičnih aktivnosti na encimu *FASN* (22).

Poleg tega so katalitične aktivnosti organizirane v 3 domene, ki jih vsebuje vsak monomer. V domeno I so združene: β -ketoacil sintaza (KS), acetil/malonil transacilaza (AT/MT) in β -hidroksiacil dehidrataza (DH). Enoil reduktaza (ER), β -ketoacil reduktaza (KR) in proteinski prenašalec acilne skupine (ACP) se nahajajo v domeni II, tioesteraza (TE) pa je v domeni III. DI in DII sta ločeni z vmesnim področjem (ID) polipeptida iz 649 aminokislin, ki nima znane katalitične aktivnosti. Vendar pa je njegova prisotnost nujna, saj povezuje oba FASN monomera in omogoča fleksibilnost strukture ter tako ustvarja dinamična aktivna centra dimera.

Vsak aktivni center za sintezo palmitata je sestavljen iz domene I ene podenote in domen II in III, ki izhajata iz drugega monomera. Ta strukturna organizacija in ureditev domen je pogoj za sintezo višjih maščobnih kislin.

Tako FASN dimer vsebuje dva aktivna centra za sintezo maščobnih kislin in oba centra sta se izkazala za sočasno aktivna (23, 24).



Slika 4: 3D struktura FASN (25).

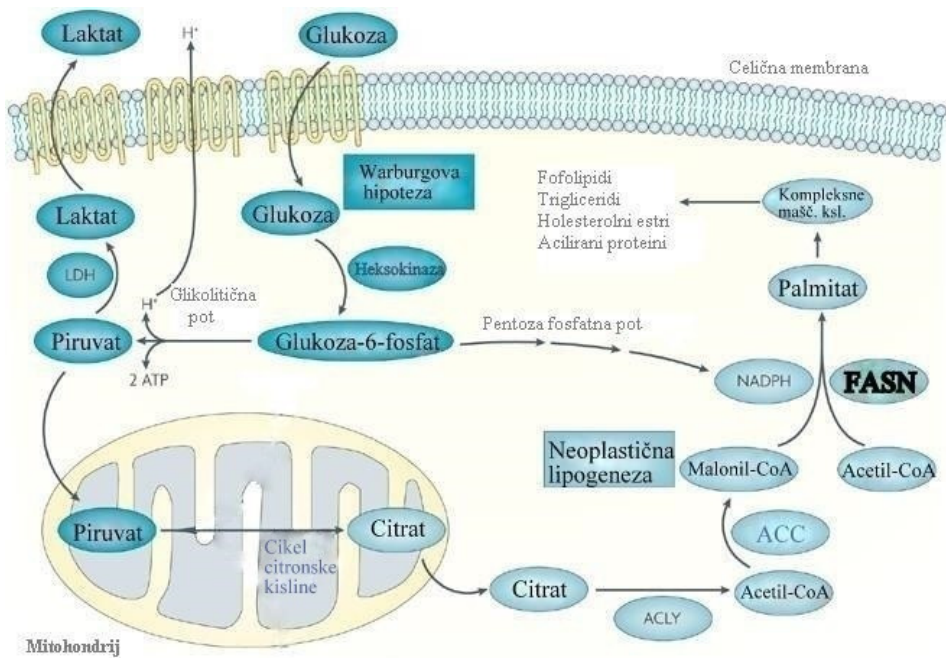
1.3.2 Vloga FASN v *de novo* sintezi maščobnih kislin

Rakave celice imajo povečane potrebe po maščobnih kislinah, saj se hitro razmnožujejo in potrebujejo lipide za proizvodnjo celičnih membran in delovanje signalnih poti, ki spodbujajo delitev celic. Potrebujejo tudi mehanizem, s katerim lahko pridobijo proste maščobne kisline za te namene. Ena od poti, s katero lahko pridobijo maščobne kisline, je *de novo* sinteza maščobnih kislin. To je proizvodnja novih maščobnih kislin z uporabo enostavnejših vhodnih snovi.

Za razliko od zdravih celic, je *de novo* sinteza maščobnih kislin v rakavih celicah pospešena, ne glede na koncentracijo prehranskih (eksogenih) maščobnih kislin. To je posledica zvišanja sintaze višjih maščobnih kislin in drugih sodelujočih encimov. *De novo* sinteza maščobnih kislin v rakavih celicah je povezana s prehodom iz oksidativne v glikolitično presnovo, saj je piruvat, končni produkt glikolize, proizveden v presežku in se lahko dalje porabi za sintezo maščobnih kislin (26).

Slika 5 prikazuje povezavo med presnovo glukoze in *de novo* sintezo maščobnih kislin v rakavih celicah. V glikolizi proizveden piruvat se prenese v mitohondrije, kjer se skozi cikel citronske kisline pretvori v citrat. Citrat se nato prenese v citoplazmo, kjer ATP citrat liaza (ACLY) katalizira njegovo pretvorbo v acetil-CoA. Tega pa Acetil-CoA karboksilaza (ACC), ki narekuje hitrost sinteze maščobnih kislin, pretvori v malonil-CoA. Sintaza višjih maščobnih kislin, glavni biosintetski encim, katalizira NADPH odvisno kondenzacijo acetil-CoA in malonil-CoA za oblikovanje palmitata in drugih nasičenih višjih maščobnih kislin (26).

Reducirajoči ekvivalenti v NADPH se pridobijo v reakciji kataliziranja z malatnim encimom ali v pentoza fosfatni poti. Nasičene višje maščobne kisline se lahko dalje spremenijo z elongazami ali desaturazami in tvorijo bolj zapletene maščobne kisline, ki se uporabljajo za sintezo različnih celičnih lipidov, kot so fosfolipidi, trigliceridi in holesterolni estri ali za acilacijo proteinov (27).



Slika 5: Presnova glukoze in *de novo* sinteza višjih maščobnih kislin v rakavih celicah (26).

1.3.3 Uravnavanje izražanja FASN

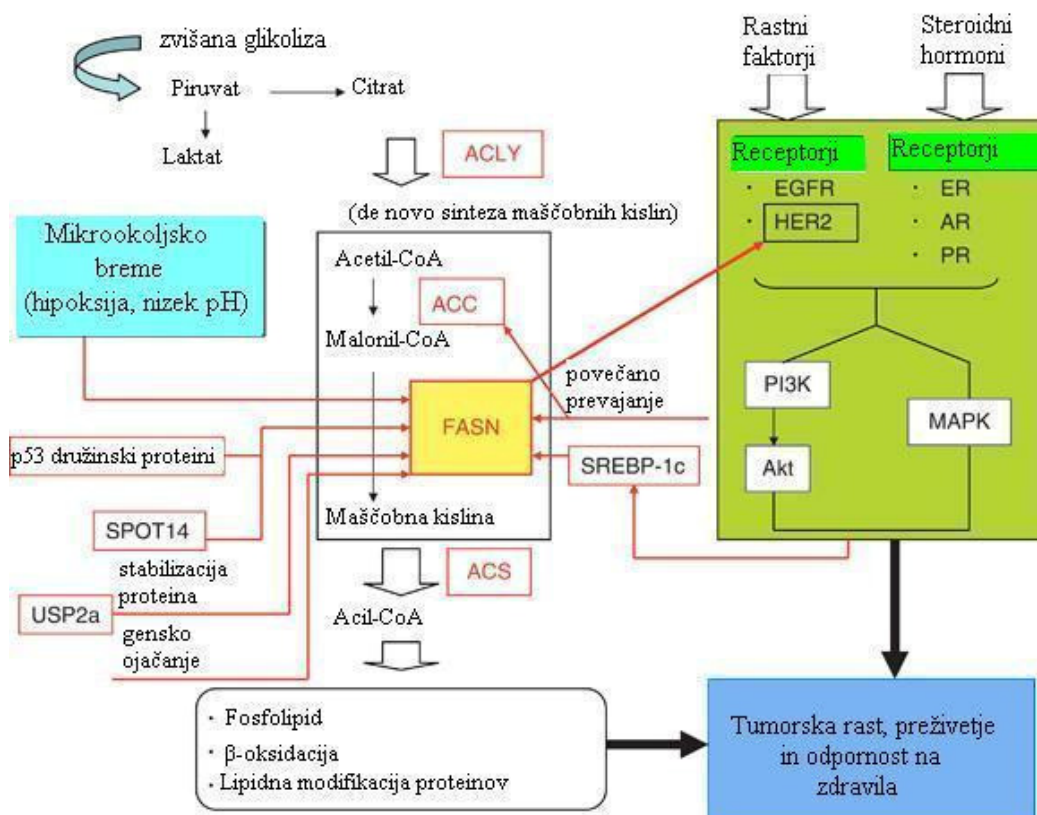
Zvečana *de novo* sinteza maščobnih kislin je posledica več mehanizmov, vključno z zvečanim izražanjem lipogenih encimov. Med njimi je zvečano izražanje gena *FASN* opaženo pri različnih človeških rakavih obolenjih. V rakavih celicah je uravnavanje transkripcije gena eden od pomembnih mehanizmov pri zvečanem izražanju *FASN* (12). Izražanje *FASN* uravnavajo rastni dejavniki – receptorji za rastni dejavnik, vključno z receptorjem za epidermalni rastni dejavnik (EGFR) in HER2, ter steroidni hormoni – receptorji za steroidne hormone, kot so estrogenski receptor (ER), androgenski receptor (AR) in progesteronski receptor (PR). Pomembni sta tudi fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K)-Akt in mitogen-aktivirana protein kinaza (MAPK). Te signalne poti sodelujejo pri uravnavanju izražanja *FASN* tako, da aktivirajo od sterola odvisen regulatorni element vezoči protein 1c (SREBP-1c).

Uravnavanje izražanja *FASN* z receptorji za rastne dejavnike ni enostavno. Predlagano je medsebojno uravnavanje med *FASN* in signalizacijo odvisno od ravnega dejavnika. HER2 sproži izražanje *FASN* preko PI3K signalizacije. Nasprotno pa so poročali tudi o regulaciji

HER2, ki je odvisna od izražanja *FASN*. Novejše raziskave so pokazale, da izražanje *FASN* ni le pod nadzorom SREBP-1c, ampak tudi pod drugimi transkripcijskimi dejavniki, kot so p53 družinski proteini in od lipogeneze odvisen jedrni protein SPOT 14. Slednji predvsem pri tumorjih dojč.

Pri izražanju *FASN* je poleg znotrajceličnih signalnih molekul pomembno tudi zunajcelično mikrookoljsko breme. Trdni tumorji so pogosto ovrednoteni z edinstvenim patofiziološkim mikrookoljem, kot so hipoksija, nizek pH in stradanje hranil. Sovražno mikrookolje aktivira številne znotrajcelične signalne poti, ki pospešijo malignen potek. Hipoksija in nizek pH sprožita izražanje *FASN* v rakavih celicah. Hipoksija uravnava SREBP-1, glavni transkripcijski regulator *FASN* gena, preko fosforilacije Akt.

Poleg transkripcijskega uravnavanja *FASN*, pa so prisotne tudi posttranskripcijske modifikacije. Graner in sod. (28) so ugotovili, da izopeptidaza USP2a (ubikvitin-specifična proteaza-2a) interagira in stabilizira *FASN* pri raku prostate. Veliko število kopij gena *FASN* je tudi pri adenokarcinomu prostate. Te ugotovitve kažejo, da bi lahko bilo od tumorja odvisno zvišano izražanje *FASN* uravnava na več ravneh, kar prikazuje tudi slika 6 (11, 29).



Slika 6: Molekularni mehanizmi uravnavanja izražanja *FASN* v rakavi celici (11).

1.3.4 FASN kot tarča protitumornih učinkovin

V primerjavi z zdravimi človeškimi tkivi izraža velika skupina rakov, vključno z rakom debelega črevesa, prostate, jajčnikov, dojke in endometrija, visoko raven aktivnosti sintaze višjih maščobnih kislin, primarnega encima, odgovornega za sintezo maščobnih kislin. Ta razlika v izražanju FASN je vodila v raziskave tarčnega zdravljenja v terapiji tumorjev (30).

1.3.4.1 Zaviralci FASN

Cerulenin:

Cerulenin je naravni produkt glive *Cephalosporium caerulens*, ki ireverzibilno zavira encim FASN s kovalentno vezavo na cistein v aktivnem mestu β -ketoacil sintazne molekule (KS) ter tako deluje citotoksično na raznolike človeške celične linije raka *in vitro*. *In vivo* pa je njegova uporabnost majhna, saj je zaradi prisotne epoksidne skupine v strukturi preveč kemično reaktiven. Zato so razvili sintezni, kemično stabilnejši zaviralec sesalske FASN – C75 (12, 30, 31).

C75 (α -metilen- γ -butirolakton):

C75 je iz cerulenina pridobljen polsintetični zaviralec FASN brez reaktivne epoksi skupine in ima selektivno protitumorno delovanje. Zdravljenje s C75 povzroči hitro hujšanje in izgubo maščobne mase, zato je terapevtsko omejen (32). C75 zmanjša vnos hrane tako, da blokira proizvodnjo anoreksičnega hipotalamusnega neuropeptida-Y, hkrati pa neposredno stimulira aktivnost encima karnitin palmitoiltransferaze I (CPT-1), ki je odgovoren za regulacijo mitohondrijske oksidacije maščobnih kislin (12). Farmakološka ločitev stimulacije CPT-1 od zaviranja FASN je privedla do razvoja zaviralca FASN druge generacije - C93, ki deluje citotoksično na tumorske celice *in vitro* in *in vivo*, ne da bi zmanjšal telesno maso ter je visoko učinkovit in specifičen pri nedrobnoceličnem pljučnem raku (32).

Orlistat:

Beta-lakton orlistat (Xenical, tetrahidrolipstatin, Evropska agencija za zdravila (EMA) je odobrila zdravilo proti debelosti) zavira FASN tako, da blokira TE domeno, ki je odgovorna za sprostitvev končnega produkta - palmitata. Ker je orlistat slabo topen v vodi

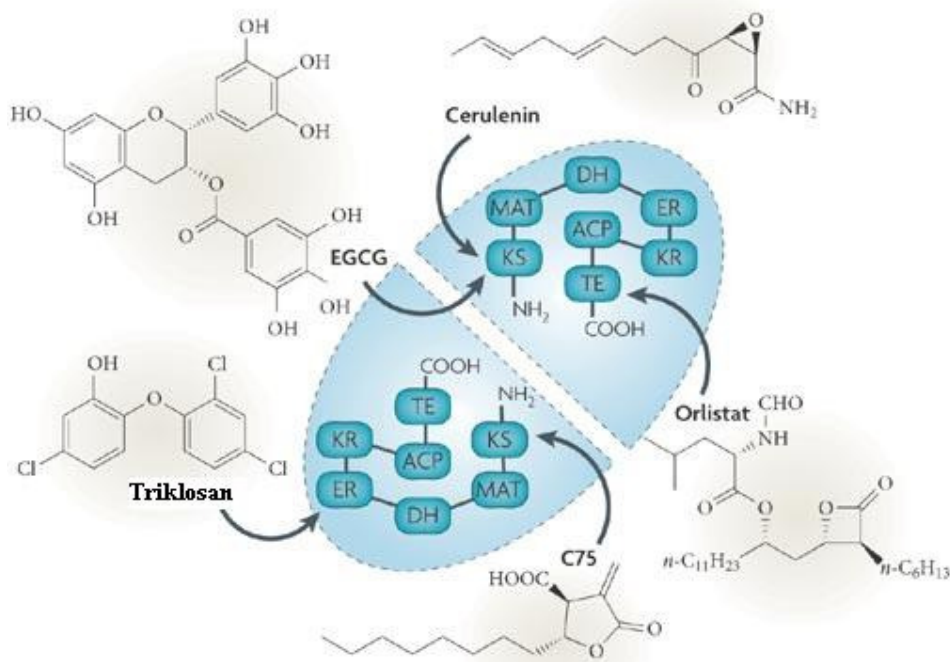
in ima nizko peroralno biološko uporabnost, bo potrebna nova formulacija za zdravljenje tumorjev, ki niso omejeni na prebavni trakt (26).

Triklosan:

Triklosan je široko uporaben antibiotik v milih, ustnih vodah in drugih peroralnih zobnih pastah, za katerega je bilo dokazano, da blokira aktivnost FASN z zaviranjem ER domene (26).

Epigalokatehin-3-galat (EGCG):

Komponenta zelenega čaja EGCG dokazano podobno deluje kot cerulenin in C75 z blokado KS domene FASN. Tudi ostali, EGCG sorodni polifenoli (flavonoidi luteolin, kvercetin in kampferol), blokirajo KS aktivnost FASN (26).



Slika 7: Strukture in mesto delovanja zaviralcev FASN (26).

1.3.4.2 Citotoksični mehanizmi zaviranja FASN

Natančen mehanizem zaviranja FASN s povzročeno celično smrtjo v rakavih celicah je še vedno neznan. Predlaganih je več poti:

Celično stradanje končnega produkta:

FASN ima pomembno vlogo pri sintezi fosfolipidov, ki jih potrebujejo novo sintetizirane celične membrane hitro rastočih tumorskih celic. Tumorocidni učinki, ki se pojavijo po zaviranju FASN, se lahko nanašajo na celično stradanje fosfatidilholina. V skladu s tem, zaviranje s holin kinazo katalizirane *de novo* sinteze fosfatidilholina, inducira apoptozo selektivno v rakavih celicah.

Motnja membranske funkcije:

S tumorjem povezana aktivnost FASN je v glavnem vključena v pridobivanje fosfolipidov, ki se razdelijo v membrane mikrodomen, ki so odporne na detergent (lipidni skupki). Zaviranje FASN, s sprožitvijo sprememb v sintezi membrane fosfolipidov in sestavljanje lipidnih skupkov, lahko poslabša pravilno lokalizacijo in/ali delovanje tirozinskih kinaznih receptorjev (kot je receptor za epidermalni rastni dejavnik (EGFR, znan tudi kot ERBB1) in ERBB2) na celičnih membranah tumorskih celic.

Zaviranje replikacije DNA:

Biosinteza fosfolipidov je največja med G1 in S fazo. Zaviranje FASN povzroči hitro, močno zaviranje podvojevanja DNA. To vodi do zaustavitve v celičnem ciklu pred G1 z molekularnim mehanizmom, ki lahko med drugim vključuje od ciklina odvisne kinazne zaviralce p21 in p27, BRCA1, SKP2 in jedrni dejavnik kappaB (NFκB).

S p53 uravnavan negenotoksični metabolni stres:

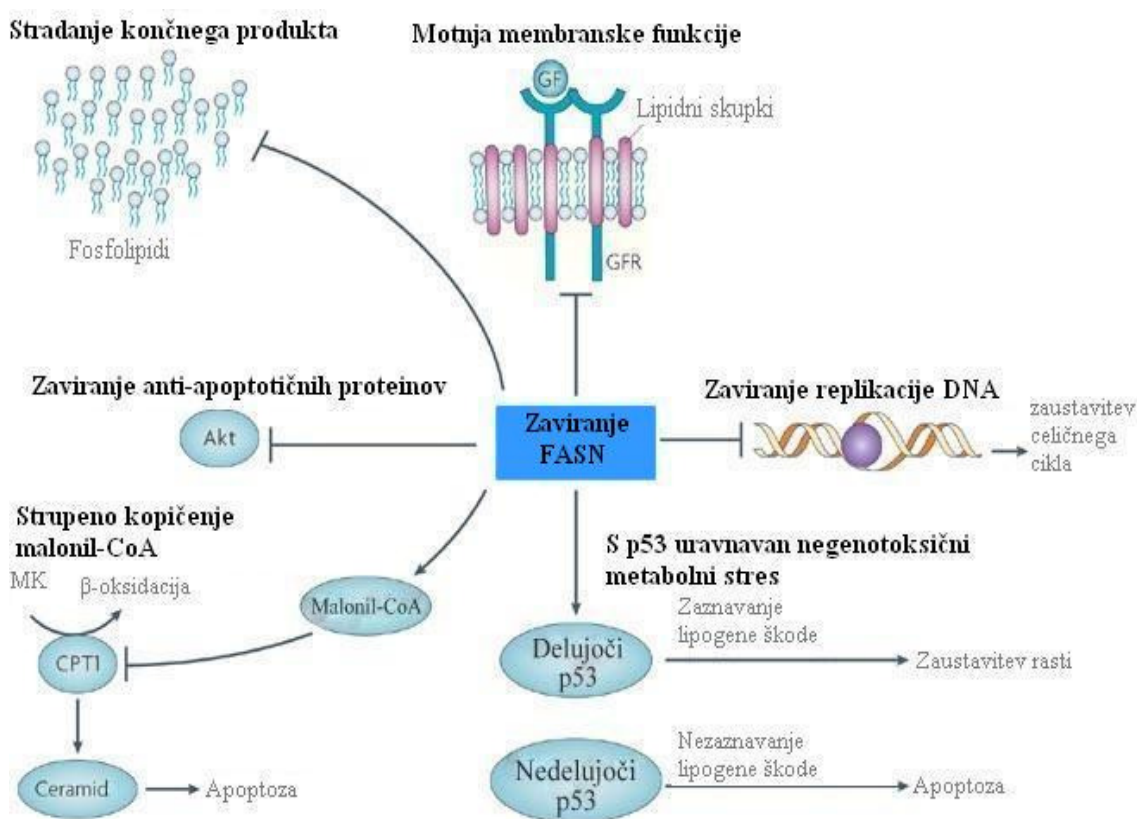
Status p53 močno vpliva na odločitev med apoptozo in zaustavitvijo rasti po zaviranju FASN. FASN zaviralci so bolj učinkoviti pri sprožitvi apoptoze v tumorskih celicah z nedelujočim p53, medtem ko celice z brezhibno delujočim p53 ponavadi kažejo citostatične odgovore.

Strupeno kopičenje malonil-koencima A:

Zaviranje FASN povzroča kopičenje substrata reakcije, to je malonil-CoA. Ta zavira s CPT1 uravnava β -oksidacijo maščobnih kislin, kar spodbuja kopičenje sfingolipida ceramida. Temu sledi sprožitev pro-apoptotičnih genov, ki so vključeni v apoptozno pot, posredovano s ceramidom (BNIP3, TRAIL in DAPK2).

Zaviranje anti-apoptotičnih proteinov:

Zaviranje FASN povzroči zmanjšanje Akt, kar povzroči sprožitev apoptoze tumorskih celic *in vitro* in *in vivo* (26).



Slika 8: Citotoksični mehanizmi zaviranja FASN (26).

Nadaljnje raziskave o uravnavanju teh poti bodo ponudile nove strategije za zdravljenje tumorjev, kot tudi za učinkovito preprečevanje raka.

2 NAMEN DELA

V okviru diplomskega dela bomo skušali ugotoviti potencialni pomen sintaze višjih maščobnih kislin pri preskrbi tumorja z maščobnimi kislinami. FASN je namreč edini protein človeškega genoma, ki je sposoben intracelularne reduktivne *de novo* sinteze višjih maščobnih kislin. Njegova prisotnost je zvečana pri mnogih rakih in v nekaterih primerih je bila potrjena prognostična pomembnost.

Preučiti želimo ali je izražanje gena *FASN* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu višje kot v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika. Želimo tudi ugotoviti ali je izražanje gena *FASN* morda povezano s kliničnimi podatki bolnikov: stadij bolezni, histološki tip tumorja, starost, spol, izguba telesne teže bolnikov pred operacijo, število let kajenja, 4-letno preživetje bolnikov. Zanima pa nas tudi ali obstaja korelacija z lipoproteinsko lipazo.

Glede na že izvedene raziskave in dobljene podatke predvidevamo:

1. da je izražanje gena *FASN* višje v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu kot v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika;
2. da je izražanje gena *FASN* povezano vsaj s katerim od opazovanih kliničnih podatkov.

Za dokaz prve hipoteze bomo z uporabo metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času izmerili izražanje gena *FASN* v tumorskem in v sosednjem netumorskem tkivu 42 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Rezultate meritev bomo statistično ovrednotili in jih primerjali s kliničnimi podatki bolnikov ter tako poskušali dokazati še drugo hipotezo.

Čeprav izražanja gena *FASN* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu ni izmeril še nihče, pričakujemo, da bomo hipotezi dokazali, saj ima FASN pomembno vlogo pri sintezi maščobnih kislin, ki so bistvene za preživetje tumorskih celic. Glede na naravo kliničnih podatkov predvidevamo tudi, da obstaja povezava med njimi in izražanjem gena *FASN*, saj naj bi zvišano izražanje gena *FASN* pomenilo boljšo preskrbo tumorja s hranilnimi snovmi, kar pa bi lahko vodilo v napredovanje bolezni, agresivnejši histološki tip tumorja in nižje 4-letno preživetje.

Potrjene hipoteze bi pomenile, da bi bilo smiselno iskanje zaviralcev izražanja gena *FASN*. Z zaviranjem izražanja gena bi preprečili nadaljni razvoj tumorja in povzročili propad rakavih celic.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci

Izražanje gena *FASN* smo analizirali v 84 vzorcih cDNA, ki so jih v predhodnih raziskavah pripravili iz vzorcev tkiv 42 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom v stadiju I, II in III. Vključitveni kriterij je bil tumor pljuč brez metastaz, ki se ni vraščal v okolno tkivo. Vsakemu bolniku so odvzeli dva tkivna vzorca, in sicer prvega iz periferije tumorja, kjer je območje največje rasti in drugega iz zdravega, nerakavega pljučnega tkiva. Mesto odvzema zdravega, nerakavega pljučnega tkiva je bilo od tumorja oddaljeno vsaj 10 cm, tkivo pa je bilo organoleptično neprizadeto. Tkivne vzorce so odvzeli najkasneje v 15 minutah po resekciji pljuč. Vzorce tkiv so do analize shranili najprej v tekočem dušiku, izolirane mRNA prepisane v cDNA pa v zamrzovalniku na -80 °C. Histološke analize tumorskih tkiv vzorcev so izvedli po histološki klasifikaciji WHO (33). Stadiji so bili določeni po TNM klasifikaciji (34). Študijo je odobrila nacionalna etična komisija, dovoljenje so dobili tudi od vseh študijskih udeležencev.

Bolnike so opazovali 4 leta. Prvi 2 leti so jih pregledovali vsake 3 mesece, naslednji 2 leti pa vsakih 6 mesecev. Klinični status in rezultati rentgenskega slikanja so bili podani v času preiskave. V primeru suma na napredovanje bolezni so opravili bronhoskopijo in računalniško tomografijo. Bolniki v stadiju III so bili postoperativno zdravljeni tudi s kemoterapijo.

3.2 Materiali in aparature

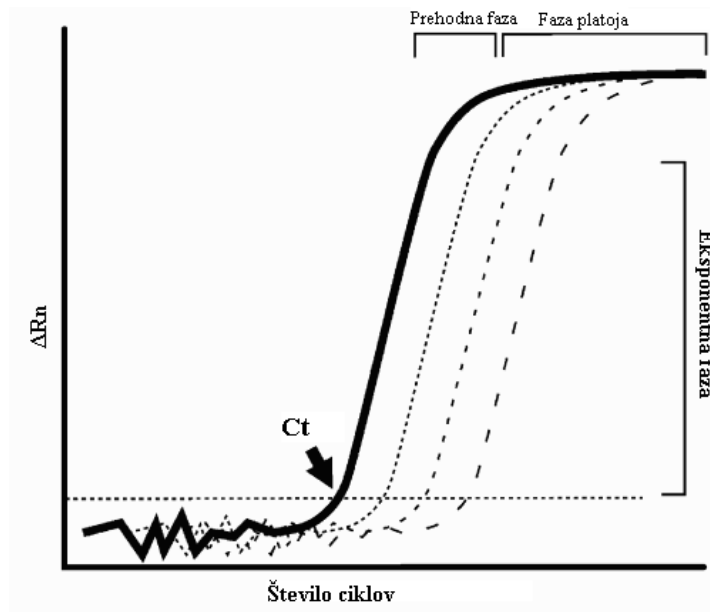
- **Droben laboratorijski material:**
 - Eppendorf avtomatske pipete: 0.5-10 µl, 2-20 µl, 100-1000 µl
 - nastavki za pipete
 - Eppendorf mikroepuete: 0.2, 0.5, 1.5 in 2 ml
 - stojalo za mikroepuete
 - prozorna samolepilna folija
 - ploščica za PCR v realnem času s 96 vdolbinicami (Applied Biosystems)

- **Aparature:**
 - avtoklav
 - brezprašna PCR komora
 - vibracijsko mešalo (BIOSAN)
 - centrifugirka (CENTRIC 322A)
 - hladilnik (+2 do +8 °C)
 - zamrzovalnik (-80 °C)
 - aparat za PCR v realnem času ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems)

3.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

3.3.1 Princip metode

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času predstavlja nadgradnjo konvencionalnega PCR. Sinonim zanj je kinetični ali kvantitativni PCR (qPCR), ker omogoča merjenje količine produkta v posameznih ciklih med samo reakcijo. Kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da izmerimo količino produkta PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi. Pomnoževanje in detekcija torej potekata sočasno in temeljita na merjenju fluorescence. Na osnovi izmerjenih podatkov narišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov. Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto intenziteto fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Nato, kot kaže slika 9, za vsak vzorec določimo cikel, pri katerem izmerjena fluorescenca preseže ta prag (Ct). Pri večjem začetnem številu kopij matrice signal prej preseže linijo fluorescenčnega praga in zato določimo nižji Ct. Vrednosti Ct so obratnosorazmerne z začetnim številom kopij matrice in na njihovi osnovi primerjamo vzorce med seboj. S primerjavo vrednosti Ct vzorcev z vrednostmi Ct standardov z znanim številom kopij matrice, lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu. Pri merjenju izražanja genov nam pogosto zadostuje podatek o razliki med vzorci, zato rezultate podajamo relativno, kot razmerje med mRNA ali DNA v različnih vzorcih (35, 36).



Slika 9: Prikaz krivulje jakosti fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri PCR v realnem času (37).

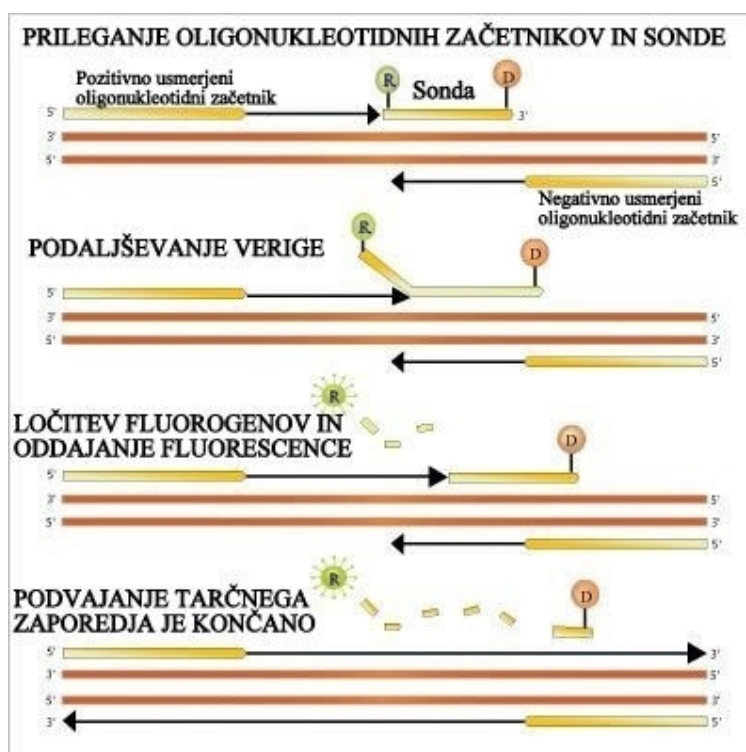
Obstaja več načinov za detekcijo produktov pomnoženih s PCR v realnem času. Razdelimo jih lahko v dve skupini glede na to ali z njimi zaznamo samo specifični produkt ali pa zaznamo tudi morebitno prisotne nespecifične produkte.

Med nespecifične načine detekcije spadajo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v nastajajočo dvoverižno DNA, kot sta etidijev bromid in SYBR Green I. Etidijevega bromida se danes skoraj ne uporablja več. SYBR Green I ima v prosti obliki nezaznavno fluorescenco, vgrajen v dvoverižno DNA pa ob vzburjenju močno fluorescira. Količina fluorescence je tako sorazmerna s količino nastale dvoverižne DNA. S to metodo ne zaznamo samo specifičnih produktov, ampak vso dvoverižno DNA, ki je prisotna v zmesi, zato je za njeno uporabo potrebna natančna optimizacija (36).

Pri specifičnih načinih detekcije uporabljamo s fluorofori označene oligonukleotide. Ti se specifično vežejo na odsek DNA, ki ga pomnožujemo. Za meritev signala izkoriščamo princip FRET tehnologije – Förster resonance energy transfer ali Fluorescence resonance energy transfer – princip fluorescentnega resonančnega prenosa energije iz donorske na akceptorsko molekulo. V ta namen uporabljamo dva fluorofora, katerih ekscitacijski in

emisijski spekter se prekrivata. Ko sta fluorofora dovolj blizu, vzburljenje donorskega barvila povzroči sevanje svetlobe. Ta vzburi akceptorsko barvilo, ki posledično seva svetlobo drugačne valovne dolžine. Kot sprejemnike lahko uporabljamo tudi molekule, ki absorbirajo svetlobo donorske molekule, same pa ne fluorescirajo (36). Najpogosteje se uporabljajo hidrolizirajoče in hibridizacijske sonde ter molekularna svetila.

Pri hidrolizirajočih sondah izkoriščamo 5'-eksonukleazno aktivnost DNA-polimeraz. Najpogosteje se uporablja *Taq* DNA-polimeraza. V reakcijsko zmes dodamo sondo, ki se specifično veže na tarčno zaporedje na DNA in dva neoznačena primerja na obeh koncih sonde. Sonda ima na obeh koncih vezana različna fluorofora. Na 5' koncu je vezano donorsko barvilo (reporter), ki seva fluorescenco. Na 3' koncu pa je vezano akceptorsko barvilo (dušilec), ki to fluorescenco prestreže. 5'-eksonukleazna aktivnost *Taq* DNA-polimeraze povzroči v stopnji podaljševanja hidrolizo sonde. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se poveča in onemogoči prestrezanje fluorescence. Fluorescenca reporterskega barvila zato poraste in je sorazmerna s količino produkta PCR (slika 10). Na tej metodi temelji TaqMan analiza (Applied Biosystems) (36, 38).



Slika 10: Princip delovanja PCR v realnem času s sondo TaqMan (39).

Hibridizacijske sonde vključujejo dve sekvenčno specifični sondi. Prva je označena z donorskim, druga pa z akceptorskim fluoroforom. V stopnji prileganja se zaporedno vežeta na odsek, ki ga pomnožujemo. Vzburjenje donorskega fluorofora na 3' koncu prve sonde povzroči prenos energije na akceptorski fluorofor na 5' koncu druge sonde. Ta seva svetlobo z daljšo valovno dolžno. Izmerjena svetloba je sorazmerna s količino nastalega produkta PCR. Ker nastane signal samo ob vezavi obeh sond na homologni in zaporedni tarčni zaporedji, so te sonde zelo specifične (36).

Molekularna svetila so hibridizacijske sonde, ki tvorijo stebelno zanko zaradi komplementarnih zaporedij na 5' in 3' koncih. Sonda ima na enem koncu vezan reporterski fluorofor, na drugem pa nefluorescentni dušilec. Kadar je sonda v obliki zanke, dušilec prepreči fluorescenco reporterskega barvila. V stopnji prileganja se sonda veže na odsek, ki ga pomnožujemo. Stebelna zanka se razpre in razdalja med reporterskim barvilom in dušilec se poveča. Fluorescenca reporterskega barvila poraste in je sorazmerna s količino nastalega produkta PCR. V stopnji podaljševanja se sonda odlepi od tarčnega zaporedja in ponovno oblikuje stebelno zanko (36).

V diplomski nalogi smo PCR v realnem času uporabili za merjenje izražanja gena *FASN*.

Za zmanjšanje števila lažno pozitivnih rezultatov je potek dela natančno določen, kar vključuje fizično ločene prostore za pripravo reakcijskih mešanic in ločen laboratorijski material (pipete, nastavki, rokavice...). Na vsako ploščico za PCR v realnem času smo dodali tudi negativno kontrolo in interni standard.

Kot negativno kontrolo smo uporabili vodo. Najbolj optimalno bi bilo, da bi izbrali vzorec, ki ne vsebuje tarčne nukleinske kisline in tako ni specifičnega PCR pomnožka. Z dodajanjem negativne kontrole se tudi prepričamo, da reagenti niso kontaminirani s tarčno nukleinsko kislino.

Interni standard pa je cDNA pljučnega tkiva naključno izbranega bolnika, ki se analizira v vsaki seriji meritev z namenom znižanja medserijske variabilnosti.

3.3.2 Potek reakcije PCR v realnem času

Za PCR v realnem času smo uporabili TaqMan kemijsko metodo.

Kot matrico smo uporabili cDNA vzorce bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom.

Postopek:

V brezprašni komori smo najprej pripravili master mix, pri čemer smo za eno reakcijo uporabili:

- 12,5 µl FastStart Universal Probe Master (Applied Biosystems)
- 0,75 µl TaqMan[®] Gene Expression Assay (Applied Biosystems) – detektor za FASN (oligonukleotidni začetniki in sonda: Hs00188012_m1)
- 10,75 µl ddH₂O

Ostali reagenti, potrebni za reakcijo PCR v realnem času:

- 1 µl cDNA vzorca tumorskega ali kontrolnega tkiva bolnika
- 1 µl cDNA internega standarda
- 1 µl ddH₂O

Količino smo pomnožili z ozirom na to, koliko reakcij smo izvedli.

Nato smo pripravili mikrotitrsko ploščico za PCR v realnem času s 96 vdolbinicami (Applied Biosystems). V vsako vdolbinico smo nanašali po 1 µl reagentov. Negativno kontrolo (ddH₂O) v dvojniku, cDNA vzorce tumorjev in kontrolnega tkiva ter interni standard pa v trojniku. Nato smo v vsako vdolbinico z reagentom dodali še 24 µl master mixa in tako je skupen volumen posamezne vdolbinice znašal 25 µl.

Tako smo pripravili vse potrebne ploščice, da smo zaobjeli vzorce vseh 42 bolnikov.

Ploščo smo nato prelepili s prozorno samolepilno folijo, njeno vsebino pretresli na vibracijskem mešalu in dali še v centrifugirko za 2 minuti na 1900 obratov. Ploščico smo nato vložili v ciklični termostat ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems), kjer je potekal PCR v realnem času.

Reakcija pomnoževanja se je začela z 2 min inkubacije pri 50 °C in nadaljevala z 10 min začetne denaturacija DNA pri 95 °C. Sledilo je 40 ciklov s temperaturnim profilom: denaturacija DNA 15 sekund pri 95 °C ter prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige 1 minuto pri 60 °C.

3.3.3 Analiza rezultatov

Podatke dobljene s PCR v realnem času smo analizirali s programom 7000 System SDS Software. Program je izračunal vrednost Ct glede na izmerjeni fluorescenčni signal in nastavljeno bazno linijo ter prag. Vrednosti smo prenesli v program Microsoft Excel in izračunali povprečne vrednosti Ct. Izražanje tarčnega gena *FASN* smo normalizirali na izražanje hišnega gena *GUS* (β -glukuronidaza). Hišni gen je bil določen že prej, in sicer s TaqMan Human Endogenous Control Plate (Applied Biosystem) po navodilih proizvajalca. V 4 parih tkiv (tumorska in netumorska), ki smo jih prevedli v cDNA in jim izmerili Ct cikle, smo ocenili izražanje 11 genov. Izbor hišnega gena je temeljil na najmanjšem geometričnem povprečju Ct cikla posameznih kandidatov in je rezultiral iz geNorm (40). Poiskali smo tistega, ki se je najbolj enakomerno izražal v vseh tkivih vseh bolnikov, neodvisno od stanja bolezni oz. vrste tumorja. Hišni gen se namreč izraža vedno enako, ne glede na bolezen. Razlike med vzorci pa so posledica razlik med izolacijo mRNA iz tkiva, uspešnosti izolacije, variabilnosti v količini odvzetega tkiva za izolacijo, kakovosti odvzetega tkiva,...

Predpostavko primerljive PCR učinkovitosti smo preverili z dilucijsko krivuljno metodo. Pozitivni rezultati so dovoljevali uporabo primerjalne metode. S primerjalno Ct metodo smo primerjali vrednosti Ct v tumorskih vzorcih z vrednostmi Ct v kontrolnih vzorcih. Povprečno PCR amplifikacijsko učinkovitost za *FASN* in *GUS* smo dobili z izračunom relativne količine mRNA *FASN* z uporabo enačbe:

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

RQ.....relativna količina mRNA *FASN*

E.....učinkovitost amplifikacije

Ct....pražni cikel

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ gena } FASN - \Delta Ct \text{ gena } GUS$$

3.4 Zanesljivost postopka in priporočila

Reagente za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času TaqMan[®] Gene Expression Assay in FastStart Universal Probe Master smo shranjevali v hladilniku, pri temperaturi +2 do +8 °C, kot je zanje predpisano. Vendar pa smo jih ob vsakem poskusu potrebovali na sobni temperaturi. Ker količina v vsaki mikroeproueti zadostuje za več meritev, smo po končanem delu preostalo količino shranili nazaj v hladilnik.

cDNA vzorce bolnikov za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času pa smo shranjevali v zamrzovalniku pri -80 °C in so bili tako ob vsakem poskusu počasi odmrznjeni na sobni temperaturi. Ko smo jim odvzeli potrebno količino, smo ostanek znova zamrznili. Z večkratnim odmrzovanjem in zamrzovanjem bi lahko povzročili spremembo v stabilnosti cDNA. Vendar število odtajanj ni bilo veliko ter iz izkušenj manjše od kritičnega, ki bi lahko okrnilo stabilnost cDNA (pod 8-krat).

Za zanesljive rezultate je pomembna uporaba svežih reagentov in sveže pripravljenih vzorcev.

3.5 Uporabljene statistične analize

Rezultati so predstavljeni kot mediana s 25. in 75. percentilom in razponom vrednosti. Primerjave parametrov med tumorskimi in kontrolnimi tkivi smo naredili z Wilxonovim testom. Mann-Whitneyev, Kruskal-Wallisov, Fisherjev ali Pearsonov χ^2 test smo uporabili za primerjave istih parametrov med posameznimi podskupinami. Povezave med parametri smo ocenili s Spearmanovo korelacijo rangov ali regresijsko analizo. Coxovo regresijsko analizo smo uporabili za oceno prognostičnega pomena opazovanih parametrov. Statistično analizo smo izvedli s SPSS v.17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Pri vseh testih smo kot statistično pomembno opredelili vrednost $p < 0,05$ (5 % tveganje).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Klinični podatki o bolnikih

Klinični podatki o bolnikih, ki so sodelovali v študiji, so povzeti v preglednici III.

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

Parameter	Podatki
število	41
spol (ženske/moški)	11/30
starost (leta)	63,0 {53,0/67,0} (44–77)
BMI (kg/m ²)	24,8 {22,2/28,3} (16,4–46,5)
izguba teže v zadnjih treh mesecih (ne/da)	24/17
kadilec (nikoli/trenutni ali bivši)	5/36
stadij bolezni (I–III)*	17/14/10
histološki tip tumorja (ploščatocelični/žlezni/velikocelični/drugi)	19/13/5/4

Vrednosti so predstavljene kot mediana {25-percentil/75-percentil} in (najmanjša vrednost–največja vrednost) ali število osebkov.

BMI – body mass index – indeks telesne mase

* po TNM klasifikaciji (34)

Med 4-letnim spremljanjem bolnikov je 1 bolnik umrl zaradi nerakavega vzroka, zato smo ga izključili iz statistične analize. 21 bolnikov je umrlo zaradi napredovanja bolezni, 20 pa jih je bilo po 4 letih še živih. V raziskavi so sodelovali pretežno moški. Teh je bilo 30, žensk pa samo 11. Povprečna starost bolnikov je bila 63 let, pri ženskah 53 let, pri moških pa 67 let.

BMI oz. indeks telesne mase je razmerje med telesno težo v kilogramih in kvadratom telesne višine v metrih. Z njegovo pomočjo ocenimo ali je telesna teža normalna, prekomerna ali prenizka. Uporaben je pri preučevanju vpliva telesne teže na zdravje in dejavnikov tveganja za razvoj bolezni povezanih predvsem z debelostjo (sladkorna

bolezen, srčno-žilne bolezni...). Skoraj polovica udeležencev študije (46 %) je imela indeks telesne mase nad 25, kar označuje prekomerno telesno težo.

17 bolnikov je v zadnjih treh mesecih pred operacijo izgubilo od 1 do 8 kilogramov telesne teže, kar je lahko posledica napredovanja rakave bolezni.

Od vseh bolnikov jih le 5 ni nikoli kadilo, medtem ko jih je 36 kadilo včasih ali celo med potekom raziskave. To je skladno z dejstvom, da je kajenje glavni dejavnik tveganja za nastanek pljučnega raka.

V študijo so bili vključeni bolniki s stadijem bolezni od I do III. V začetnih stadijih I in II je bilo 75 % udeležencev. Glede na histološki tip tumorja so prevladovali tisti s ploščatoceličnim, sledil je žlezni, za njim velikocelični, nekaj bolnikov pa je imelo drugi histološki tip raka.

4.2 Rezultati meritev izražanja gena *FASN*

Preglednica IV: Rezultati meritev Ct tarčnega gena *FASN*, hišnega gena *GUS*, normalizacija *FASN*, relativno izražanje *FASN* ter razmerje *FASN* v kontrolnem in tumorskem tkivu.

vzorec	<i>FASN</i>		<i>GUS</i>		Normalizacija <i>FASN</i>			<i>FASN</i> K	<i>FASN</i> T	<i>FASN</i>
	K	T	K	T	K	T	T/K	$2^{-\Delta Ct}$	$2^{-\Delta Ct}$	K/T
1	23,88	23,62	27,52	26,46	-3,64	-2,85	0,79	12,47	7,19	1,73
2	23,69	23,01	26,94	26,07	-3,25	-3,07	0,18	9,51	8,38	1,14
3	22,50	22,16	25,69	23,94	-3,18	-1,78	1,41	9,08	3,43	2,65
4	22,66	21,94	26,26	24,85	-3,60	-2,91	0,69	12,13	7,50	1,62
6	22,73	23,14	25,46	26,03	-2,73	-2,89	-0,16	6,62	7,41	0,89
8	23,02	24,92	25,59	25,62	-2,57	-0,70	1,86	5,92	1,63	3,64
9	21,72	23,79	25,76	25,45	-4,04	-1,66	2,38	16,41	3,16	5,19
10	23,41	23,11	25,95	25,13	-2,54	-2,02	0,52	5,80	4,05	1,43
11	23,11	25,83	26,40	25,72	-3,30	0,11	3,41	9,83	0,93	10,60
12	22,44	23,40	25,82	26,47	-3,38	-3,07	0,31	10,41	8,42	1,24
13	23,32	24,16	26,38	26,17	-3,06	-2,01	1,05	8,32	4,03	2,07
14	24,55	24,42	25,85	26,57	-1,30	-2,15	-0,85	2,46	4,44	0,55
16	23,52	24,68	25,56	26,29	-2,04	-1,60	0,44	4,11	3,04	1,35
17	23,03	24,93	26,54	26,88	-3,52	-1,95	1,57	11,45	3,86	2,96
18	24,71	24,83	25,77	25,20	-1,06	-0,37	0,69	2,09	1,29	1,62
19	22,53	22,91	25,03	25,10	-2,50	-2,19	0,31	5,66	4,56	1,24
20	23,86	25,55	25,39	26,06	-1,52	-0,51	1,02	2,87	1,42	2,02
22	23,55	25,36	26,42	26,64	-2,86	-1,28	1,58	7,28	2,43	3,00
23	26,89	25,16	25,79	25,07	1,10	0,09	-1,01	0,47	0,94	0,50
25	23,23	23,60	27,31	26,29	-4,08	-2,69	1,39	16,91	6,44	2,63
26	23,05	21,79	26,21	26,15	-3,16	-4,36	-1,20	8,94	20,46	0,44
27	22,99	24,38	26,54	25,91	-3,55	-1,53	2,02	11,67	2,89	4,04
28	24,65	24,70	25,97	27,46	-1,32	-2,76	-1,44	2,50	6,79	0,37
29	22,41	23,35	25,44	25,35	-3,02	-2,00	1,03	8,13	3,99	2,04
31	23,95	24,49	25,17	26,03	-1,22	-1,54	-0,32	2,33	2,91	0,80

32	25,37	22,03	25,04	26,40	0,33	-4,37	-4,70	0,80	20,73	0,04
33	26,52	24,68	25,67	26,48	0,84	-1,80	-2,65	0,56	3,49	0,16
34	22,75	24,34	26,04	26,41	-3,29	-2,08	1,21	9,78	4,22	2,32
35	24,30	23,36	26,38	25,41	-2,08	-2,05	0,03	4,22	4,13	1,02
37	25,50	24,33	24,85	25,04	0,65	-0,71	-1,36	0,64	1,63	0,39
38	22,79	24,66	24,97	25,35	-2,18	-0,70	1,48	4,52	1,62	2,79
39	22,33	24,08	25,93	26,72	-3,60	-2,64	0,96	12,13	6,22	1,95
40	22,53	29,29	25,72	26,72	-3,19	2,57	5,76	9,11	0,17	54,07
41	23,91	25,07	25,23	26,77	-1,32	-1,69	-0,37	2,50	3,23	0,77
42	22,50	25,03	26,48	26,17	-3,97	-1,14	2,83	15,71	2,20	7,13
43	25,28	24,61	24,35	25,74	0,94	-1,13	-2,06	0,52	2,18	0,24
44	25,08	24,20	24,40	25,22	0,68	-1,03	-1,71	0,62	2,04	0,31
45	23,39	24,09	26,53	25,39	-3,14	-1,30	1,84	8,79	2,46	3,58
46	23,29	24,60	26,14	25,72	-2,85	-1,12	1,73	7,21	2,17	3,32
47	23,95	23,55	25,88	24,91	-1,93	-1,36	0,57	3,80	2,57	1,48
48	23,73	24,15	25,67	26,20	-1,94	-2,05	-0,11	3,83	4,13	0,93
49	25,61	24,43	24,70	25,22	0,91	-0,79	-1,69	0,53	1,73	0,31
Povp.	23,73	24,34	25,85	25,91	-2,12	-1,56	0,55	6,51	4,34	3,66
SD	1,23	1,63	0,71	0,72	1,55	1,46	1,85	4,68	4,22	8,60

FASN – sintaza višjih maščobnih kislin GUS – β -glukuronidaza

K – kontrolno tkivo T – tumorsko tkivo

4.2.1 Izražanje gena *FASN* v tumorskem in kontrolnem tkivu

Dosedanje raziskave na področju sintaze višjih maščobnih kislin so pokazale, da ima večina malignih tumorjev povečano izražanje *FASN*. Vendar pa so vse te raziskave določale *FASN* imunohistokemično, torej z merjenjem proteina. Izražanja gena *FASN* v pljučnem tkivu še ni meril nihče. Prav tako ni podatka, da bi kdo izmeril izražanje gena *FASN* v tumorskem tkivu pljuč in dobljene rezultate primerjal z izražanjem v zdravem kontrolnem tkivu istih bolnikov.

Narejena pa je bila raziskava (41), kjer so merili izražanje gena *FASN* v vzorcih tumorja prostate in v 1 cm oddaljenem navidezno normalnem obtumorskem tkivu prostate (TAHN). Vrednosti so nato primerjali z izražanjem v normalnem nerakavem tkivu prostate druge skupine ljudi (kontrolna skupina). Izražanje gena *FASN* so merili z mikromrežami in z metodo reverzne transkripcije in PCR v realnem času. Ugotovili so, da je v skupini bolnikov izražanje v tumorju prostate zvečano 5,31-krat, v TAHN tkivu pa 1,93-krat v primerjavi z normalnim nerakavim tkivom prostate kontrolne skupine. Glavna ugotovitev raziskave je bil pojav zvečanega izražanja *FASN* v normalnem histološkem tkivu 1 cm od roba tumorja (TAHN) prostate. Raziskava tudi dokazuje, da bi ugotavljanje sprememb genskega izražanja *FASN* v biopsijskih vzorcih lahko bilo potencialno zanimivo tudi v raziskovalne in klinične namene.

Imunohistokemično so merili izražanje gena *FASN* tudi v pljučih. V raziskavi (42) so ugotovili, da je izražanje gena *FASN* zgodnji marker v razvoju in napredovanju ploščatoceličnega pljučnega raka, saj je bilo v skupini bolnikov izražanje *FASN* že v predrakavih lezijah ploščatoceličnega raka 2,4-krat višje kot v nerakavih celicah kontrolne skupine preiskovancev.

Dosedanje imunohistokemične analize so pokazale, da je *FASN* protein zvečan že zelo zgodaj v razvoju (42, 43) in tudi v napredovanju pljučnega raka (42, 44, 45, 46). Zato smo pričakovali, da bo izražanje gena *FASN* v tumorskem tkivu večje kot v kontrolnem tkivu.

Rezultati naše raziskave so bili v nasprotju s pričakovanji. V kontrolnem tkivu je bilo izražanje gena *FASN* 1,83-krat večje kot v tumorskem tkivu (mediana 5,92 proti mediana 3,23; $p = 0,0045$).

Izražanje gena je bilo višje v kontrolnem tkivu 27 bolnikov (66 %). Le 14 bolnikov je torej imelo višje izražanje gena v tumorskem tkivu.

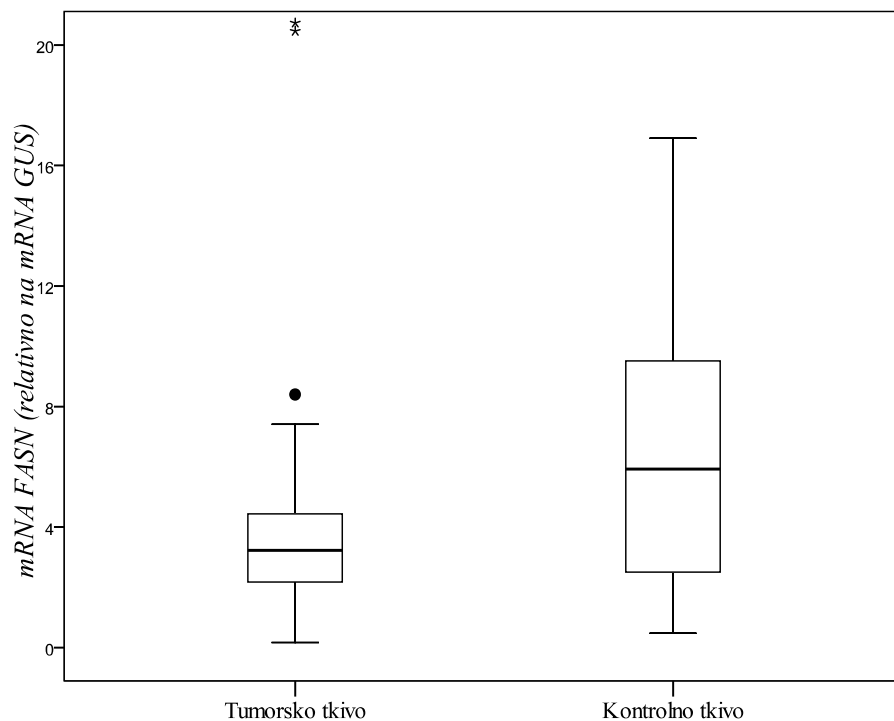
Rezultati so predstavljeni v preglednici V in na sliki 11.

Preglednica V: Deskriptivna statistika izražanja gena *FASN* v tkivu.

Parameter	Rezultati
mRNA <i>FASN</i> v tumorskem tkivu	3,23 {2,11/4,50} (0,17 – 20,73)
mRNA <i>FASN</i> v kontrolnem tkivu	5,92 {2,48/9,65} (0,47 – 16,91)

Vrednosti so predstavljene kot mediana {25-percentil/75-percentil} in (najnižja – najvišja vrednost).

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena *GUS*.



Slika 11: Statistična analiza izražanja gena *FASN* v tumorskem in kontrolnem tkivu.

Slika prikazuje največjo in najmanjšo vrednost, kvartile ter mediano za posamezno skupino vzorcev. Pri tumorskem tkivu je prikazan tudi osamelec (\cdot), ki je zunaj intervala $Q_3+1,5Q$ ter dva ekstremna osamelca (*), ki sta izven intervala $Q_3 + 3Q$.

Čeprav se naši rezultati ne ujemajo z rezultati do sedaj edine objavljene raziskave s podobno metodologijo (41), lahko to tudi pojasnimo.

Možna razlaga je, da znižana aktivnost encima v nerakavem tkivu povzroči pomanjkanje hranil in energije v obtumorskem tkivu. Posledično se v obtumorskem tkivu zveča izražanje gena *FASN*, z namenom odprave primanjkljaja in ponovne vzpostavitve ravnotežja. Domnevo bi lahko potrdili z merjenjem aktivnosti encima *FASN* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem in kontrolnem tkivu, kar pa do sedaj še ni bilo narejeno.

Možna razlaga je lahko tudi, da smo merili izražanje gena *FASN* pri premalo bolnikih in le v vzorcih bolnikov s stadijem I do III, ne pa v najbolj napredovanem, IV. stadiju, kjer bi izražanje v tumorskem tkivu morda bilo večje kot v kontrolnem.

4.2.2 Korelacija med izražanjem gena v tumorskem in kontrolnem tkivu

Glede na to, da smo primerjali tumorsko in kontrolno tkivo istega bolnika, nas je zanimalo ali med njima obstaja korelacija v izražanju gena. Rezultati so pokazali, da izražanje gena *FASN* v tumorskem tkivu mejno korelira z izražanjem gena *FASN* v kontrolnem tkivu. ($r = 0,2918$; $p = 0,0641$). To pomeni, da zvišano izražanje ni značilno le za tumorsko ali kontrolno tkivo, ampak je do zvišanega izražanja gena prišlo v obeh tkivih bolnika. Naša predvidevanja so bila, da bo izražanje gena *FASN* zvišano v tumorskem tkivu, v kontrolnem pa znižano. Tako bi bila rast in razvoj tumorja lahko utemeljena s povečano količino endogenih maščobnih kislin.

4.2.3 Izražanje gena *FASN* v različnih stadijih bolezni

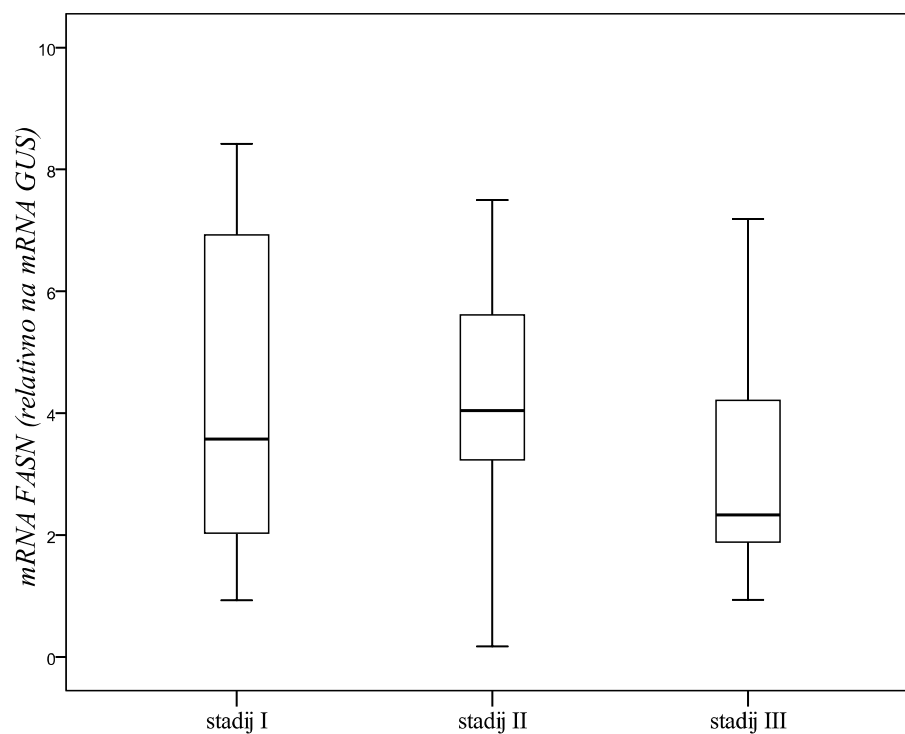
Rezultati pridobljeni s Spearmanovo korelacijo rangov, so pokazali, da izražanje gena *FASN* v tumorskem tkivu ne korelira s stadijem bolezni (stadiji od I do III). Vendar se je izkazalo, da ne glede na to, v katerem stadiju so bili bolniki, se izražanje gena *FASN* v tumorskem tkivu ni bistveno razlikovalo. S tem smo ovrgli naša predvidevanja, da je z višjim stadijem bolezni, višje tudi izražanje gena za *FASN* v tumorskem tkivu. Rezultate prikazujeta preglednica VI in slika 12. Smiselno bi bilo, da tumorsko tkivo v višjem stadiju raka potrebuje več energijskih snovi za svojo rast in razvoj in zato zveča izražanje gena *FASN*, ki omogoča endogeno pridobivanje maščobnih kislin.

Preglednica VI: Deskriptivna statistika izražanja gena *FASN* v tumorskem tkivu glede na stadij bolezni.

Parameter	Rezultati
mRNA <i>FASN</i> v tumorskem tkivu pri stadiju I	3,61 {1,83/6,39} (0,93 – 8,42)
mRNA <i>FASN</i> v tumorskem tkivu pri stadiju II	3,76 {3,14/5,61} (0,17 – 20,73)
mRNA <i>FASN</i> v tumorskem tkivu pri stadiju III	2,33 {1,81/4,39} (0,94 – 20,46)

Vrednosti so predstavljene kot mediana {25-percentil/75-percentil} in (najnižja – najvišja vrednost).

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena *GUS*.



Slika 12: Statistična analiza izražanja gena *FASN* v različnih stadijih tumorskega tkiva.

Slika prikazuje največjo in najmanjšo vrednost, kvartile ter mediano za posamezno skupino vzorcev.

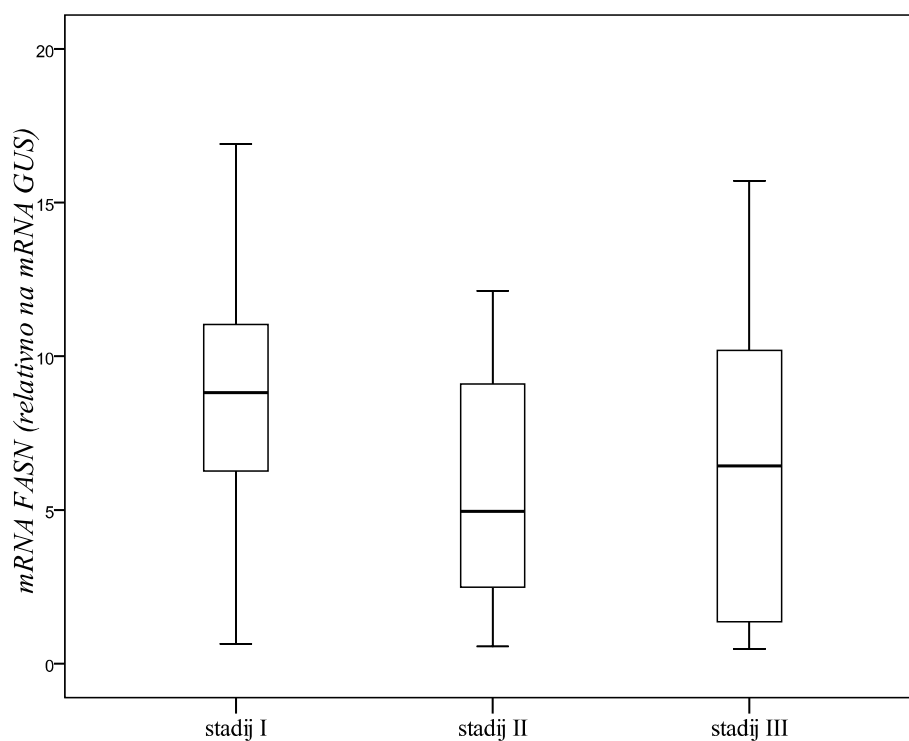
Glede na to, da je bilo izražanje gena višje v kontrolnem tkivu, smo naredili še primerjavo ali se izražanje v kontrolnem tkivu razlikuje glede na stadij bolezni. Po pregledu rezultatov, ki so prikazani v preglednici VII in na sliki 13 smo prišli do ugotovitve, da je izražanje gena *FASN* v kontrolnem tkivu v II. stadiju bolezni nižje kot v I. in III. Medtem ko med izražanjem gena v kontrolnem tkivu I. in III. stadija ni razlike.

Preglednica VII: Deskriptivna statistika izražanja gena *FASN* v kontrolnem tkivu glede na stadij bolezni.

Parameter	Rezultati
mRNA <i>FASN</i> v kontrolnem tkivu pri stadiju I	7,71 {6,10/11,36} (0,64 – 16,91)
mRNA <i>FASN</i> v kontrolnem tkivu pri stadiju II	4,96 {2,47/8,70} (0,52 – 9,78)
mRNA <i>FASN</i> v kontrolnem tkivu pri stadiju III	6,44 {0,99/10,82} (0,47 – 15,71)

Vrednosti so predstavljene kot mediana {25-percentil/75-percentil} in (najnižja – najvišja vrednost).

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena *GUS*.



Slika 13: Statistična analiza izražanja gena *FASN* v različnih stadijih kontrolnega tkiva.

Slika prikazuje največjo in najmanjšo vrednost, kvartile ter mediano za posamezno skupino vzorcev.

4.2.4 Izražanje gena *FASN* v različnih histoloških tipih

Vzorci pljučnih tumorjev bolnikov so se razlikovali po histoloških tipih. Največje število bolnikov je imelo ploščatocelični in žlezni histološki tip tumorja, zato smo želeli ugotoviti ali je med njima razlika v izražanju gena *FASN*. Pričakovali smo, da bo izražanje gena večje v žlezni histološkem tipu, za katerega je znano, da je agresivnejši in povezan s krajšim preživetjem bolnika. Podobno raziskavo so naredili tudi Wang J. in sod. (44), ki so izražanje *FASN* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu določali imunohistokemično. Izražanje *FASN* je bilo pri nežlezni tumorjih večje kot pri žlezni tumorjih bolnikov (38,4 % proti 22,4 %; $p = 0,026$).

Rezultati naše raziskave so pokazali, da med izražanjem gena *FASN* v tumorskem tkivu med ploščatoceličnim in žlezni histološkim tipom tumorja ni signifikantne razlike ($p = 0,552$), kar vidimo tudi pri primerjavi median v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Deskriptivna statistika izražanja gena *FASN* v tumorskem tkivu glede na histološki tip.

Parameter	Rezultati
mRNA <i>FASN</i> v ploščatoceličnem tumorju	3,49 {2,18/6,44} (0,17 – 20,73)
mRNA <i>FASN</i> v žlezni tumorju	3,16 {1,68/4,06} (0,94 – 20,46)

Vrednosti so predstavljene kot mediana {25-percentil/75-percentil} in (najnižja – najvišja vrednost).

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena *GUS*.

Naši rezultati so torej v nasprotju s pričakovanji. Trenutno so težko razložljivi. Prav tako pa jih tudi težko primerjamo s predhodnimi raziskavami, v katerih je bil *FASN* določen imunohistokemično.

4.2.5 Izražanje gena *FASN* in izguba telesne teže

Želeli smo ugotoviti ali je izražanje gena povezano z izgubo telesne teže v zadnjih treh mesecih pred izrezom tumorja. Najprej smo naredili primerjavo med izražanjem gena *FASN* v tumorskem tkivu bolnikov, ki niso izgubili teže, s tistimi, ki so izgubili od 1 do 8 kg telesne teže, kar je lahko posledica napredovanja bolezni. Iz podatkov v preglednici IX lahko razberemo, da je izražanje gena v tumorskem tkivu zvečano pri bolnikih, ki so izgubili telesno težo, vendar pa razlika ni statistično značilna. Izražanje gena *FASN* tudi ni koreliralo z izgubo telesne teže v kilogramih.

Preglednica IX: Deskriptivna statistika izražanja gena *FASN* v tumorskem tkivu glede na izgubo telesne teže.

Parameter	Rezultati
mRNA <i>FASN</i> v tumorskem tkivu brez izgube telesne teže	2,98 {1,66/4,11} (0,93 – 20,73)
mRNA <i>FASN</i> v tumorskem tkivu z izgubo telesne teže	4,05 {2,31/6,33} (0,17 – 20,46)

Vrednosti so predstavljene kot mediana {25-percentil/75-percentil} in (najnižja – najvišja vrednost).

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena *GUS*.

4.2.6 Izražanje gena *FASN* in kajenje

Ker je kajenje glavni dejavnik tveganja za nastanek pljučnega raka, nas je zanimalo ali se izražanje gena v tumorskem tkivu bolnikov razlikuje med kadilci in nekadilci. Statistična analiza je pokazala, da imajo kadilci in nekdanji kadilci, 55 % večje izražanje gena *FASN* kot nekadilci (preglednica X). Vendar pa razlika ni statistično značilna. Rezultate raziskave je težko primerjati, saj je bilo med preiskovanci kar 36 kadilcev in le 5 nekadilcev.

Izražanje gena *FASN* v tumorskem tkivu prav tako ni koreliralo s številom pokajenih cigaret niti s številom kadilskih let.

Preglednica X: Deskriptivna statistika izražanja gena *FASN* v tumorskem tkivu glede na kajenje.

Parameter	Rezultati
mRNA <i>FASN</i> v tumorskem tkivu kadilcev	3,36 {2,19/4,53} (0,17 – 20,73)
mRNA <i>FASN</i> v tumorskem tkivu nekadilcev	2,17 {1,68/4,94} (1,63 – 6,44)

Vrednosti so predstavljene kot mediana {25-percentil/75-percentil} in (najnižja – najvišja vrednost).

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena *GUS*.

4.2.7 Izražanje gena *FASN* in preživetje

V izražanju gena *FASN* v tumorskem tkivu med preživeli in preminulimi bolniki 4 leta po operaciji nismo zaznali statistično signifikantne razlike (preglednica XI). Pričakovali smo, da bo izražanje gena višje v tumorskem tkivu preminulih bolnikov, saj bi to potrdilo našo domnevo o nujni učinkovitejši preskrbi raka z maščobnimi kislinami za agresivnejši potek bolezni.

Preglednica XI: Deskriptivna statistika izražanja gena *FASN* v tumorskem tkivu pri živih in pokojnih bolnikih.

Parameter	Rezultati
mRNA <i>FASN</i> v tumorskem tkivu pri živih	3,20 {1,66/4,13} (0,93 – 20,73)
mRNA <i>FASN</i> v tumorskem tkivu pri pokojnih	3,43 {2,19/5,68} (0,17 – 20,46)

Vrednosti so predstavljene kot mediana {25-percentil/75-percentil} in (najnižja – najvišja vrednost).

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena *GUS*.

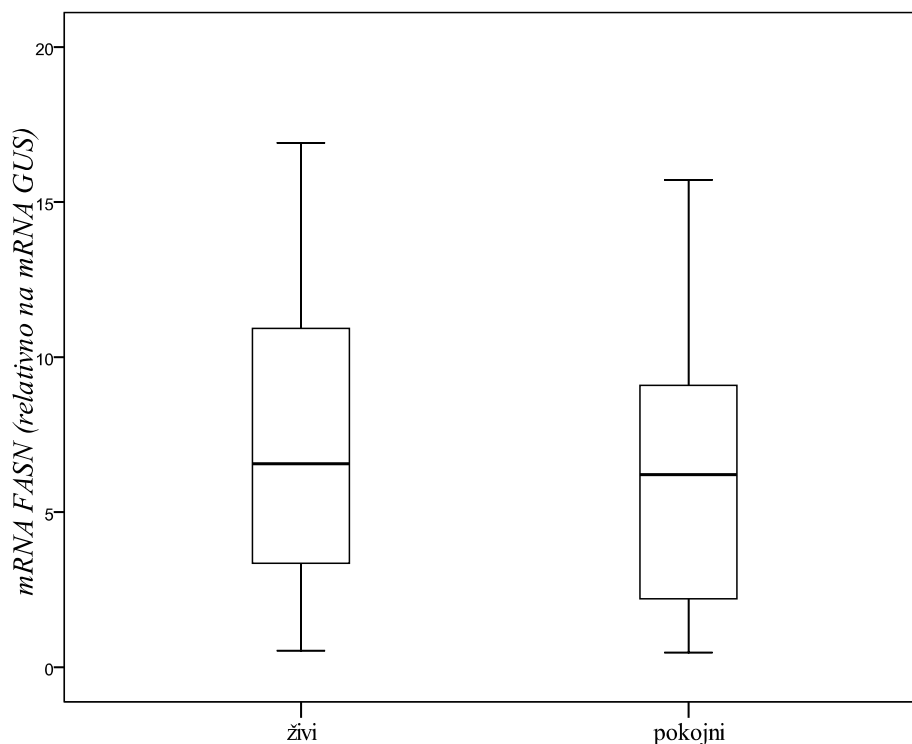
Naredili smo še statistično analizo izražanja gena *FASN* v kontrolnem tkivu živih in pokojnih bolnikov. Primerjava tudi v tem primeru ni pokazala statistično signifikantne razlike (preglednica XII, slika 14). Če bi rezultati pokazali signifikantno nižje izražanje gena v kontrolnem tkivu preminulih, bi lahko sklepali, da je zdravo tkivo izčrpano. Izguba telesne teže pa je zelo pogosto povezana z napredovanjem bolezni.

Preglednica XII: Deskriptivna statistika izražanja gena *FASN* v kontrolnem tkivu pri živih in pokojnih bolnikih.

Parameter	Rezultati
mRNA <i>FASN</i> v kontrolnem tkivu pri živih	6,57 {3,11/11,19} (0,53 – 16,91)
mRNA <i>FASN</i> v kontrolnem tkivu pri pokojnih	5,80 {2,21/9,10} (0,47 – 15,71)

Vrednosti so predstavljene kot mediana {25-percentil/75-percentil} in (najnižja – najvišja vrednost).

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena *GUS*.



Slika 14: Statistična analiza izražanja gena *FASN* v kontrolnem tkivu živih in pokojnih bolnikov 4 leta po operaciji.

Slika prikazuje največjo in najmanjšo vrednost, kvartile ter mediano za posamezno skupino vzorcev.

4.2.8 Prognostičen pomen izražanja gena *FASN* v tumorskem tkivu

Prognostičen pomen sintaze višjih maščobnih kislin v rakavem tkivu pljuč so v preteklosti že raziskovali.

Wang in sod. (44) so izmerili protein FASN imunohistokemično pri 175 bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Preminuli bolniki so imeli višje vrednosti kot preživeli, vendar je bila razlika na meji signifikantnosti ($p = 0,066$). Prognostičen pomen proteina FASN so ugotovili le pri bolnikih s stadijem I, saj je bilo preživetje FASN pozitivnih bolnikov v stadiju I krajše kot pri FASN negativnih ($p = 0,005$). V še eni raziskavi (45) so izmerili protein FASN imunohistokemično pri 84 bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim rakom v stadiju I. FASN pozitivnih bolnikov je bilo 29,8 % in pri njih so odkrili krajše preživetje kot pri FASN negativnih (35,1 % proti 66,1 %; $p = 0,0079$). Tako so potrdili predhodna opažanja, da je FASN neodvisni prognostični kazalec preživetja bolnikov s stadijem bolezni I. V tretji raziskavi (46) so določili protein FASN imunohistokemično pri 106 bolnikih z NSCLC. FASN pozitivnih je bilo 57,54 % bolnikov. V nasprotju s prejšnjima raziskavama niso potrdili prognostičnega pomena proteina FASN ($p = 0,14$). Ugotovili pa so, da imajo FASN negativni bolniki v stadiju I tendenco boljšega preživetja, čeprav tudi v tem primeru razlika ni bila statistično značilna ($p = 0,10$).

Čeprav so Piyathilake CJ in sod. (42) ugotovili, da se protein FASN pojavi že zelo zgodaj razvoja in napredovanja ploščatoceličnega pljučnega raka, prav tako niso uspeli najti povezave med proteinom FASN v ploščatoceličnem karcinomu pljuč in preživetjem bolnika.

Tudi v naši raziskavi smo proučili morebiten prognostičen pomen izražanja gena *FASN*. Coxova regresijska analiza je pokazala, da izražanje gena *FASN* v tumorskem tkivu (in tudi v kontrolnem tkivu) ni napovedovalo 4-letnega preživetja bolnika in torej nima prognostičnega pomena (rezultati statistične analize niso prikazani). Naše zaključke je tudi v tem primeru težko primerjati z zaključki predhodnih raziskav, v katerih je bil protein FASN določen imunohistokemično. Prav tako so izsledki predhodnih raziskav povsem nasprotujoči.

4.2.9 Izražanje gena *FASN* in lipoproteinska lipaza

Lipoproteinska lipaza hidrolizira trigliceride do prostih maščobnih kislin in glicerola. Nastaja predvsem v maščobnem tkivu, srčnih in skeletnih mišicah ter v diferenciranih makrofagih, možganih, placenti, pljučih in β -celicah pankreasa.

V tkivih istih bolnikov, v katerih smo izmerili izražanje gena *FASN*, so v preteklosti že izmerili tudi aktivnost lipoproteinske lipaze (LPL) in izražanje gena za LPL. Aktivnost LPL je bila v rakavem tkivu 1,9-krat višja kot v sosednjem nerakavem tkivu ($p < 0,0001$). Izražanje gena *LPL* pa je bilo v kontrolnem tkivu 3,8-krat višje kot v tumorskem tkivu ($p < 0,0001$) (40).

Glede na to, da je bilo tako izražanje gena *FASN*, kot tudi gena *LPL*, zvišano v kontrolnem tkivu, smo naredili še primerjavo med njima. Ugotovili smo, da je izražanje gena *FASN* v kontrolnem tkivu koreliralo z izražanjem gena *LPL* v kontrolnem tkivu ($r = 0,3403$; $p = 0,0295$).

Prav tako smo našli korelacijo med izražanjem gena *FASN* v kontrolnem tkivu in aktivnostjo LPL v kontrolnem tkivu ($r = 0,3767$; $p = 0,0152$).

Zvišana aktivnost LPL v tumorju pomeni potencialen mehanizem preskrbe rakavega tkiva s prostimi maščobnimi kislinami. S tem je izboljšana preskrba tumorja z energijo in pomembnimi gradniki, ki mu omogočajo rast in razvoj. Zvišano izražanje gena za LPL v kontrolnem (netumorskem) tkivu bi lahko razložili kot posledico znižane aktivnosti LPL v netumorskem tkivu, kar vodi v nizek hranilni in energijski status netumorskega tkiva in posledično zvečano izražanje gena za LPL, da se odpravi pomanjkanje in ponovno vzpostavi ravnovesje (40). Enako bi lahko razložili zvečano izražanje *FASN* v netumorskem tkivu (v primerjavi s tumorskim), torej kot posledico pomanjkljivega hranilnega in energijskega statusa netumorskega tkiva, ki vodi v zvečano izražanje gena *FASN*, z namenom odprave pomanjkanja in ponovne vzpostavitve ravnotežja. Za potrditev naše domneve pa bi morali izmeriti aktivnost *FASN* v rakavem in kontrolnem tkivu.

5 SKLEP

V raziskavi smo želeli preučiti izražanje gena *FASN* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu.

Z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času smo izmerili izražanje gena *FASN* v tumorskem in v sosednjem netumorskem tkivu 42 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Ugotovili smo, da je izražanje gena *FASN* v kontrolnem tkivu 1,83-krat višje kot v tumorskem tkivu in s tem zavrnili našo prvo hipotezo.

Izražanje gena *FASN* v tumorskem in sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu ni bilo povezano z nobenim od opazovanih kliničnih podatkov bolnikov (stadij bolezni, histološki tip tumorja, izguba telesne teže bolnikov pred operacijo, kajenje, 4-letno preživetje bolnikov) in nima prognostičnega pomena, kar pomeni, da nismo uspeli potrditi niti naše druge hipoteze.

Prišli smo tudi do ugotovitve, da je izražanje gena *FASN* v kontrolnem tkivu koreliralo z aktivnostjo LPL in izražanjem gena za LPL. Zvišana aktivnost LPL v tumorskem tkivu dokazano napoveduje krajše preživetje bolnikov, zato bi bilo zanimivo meriti tudi aktivnost *FASN* in preučevati povezanost *FASN* in LPL pri preskrbi rakavega tkiva z maščobnimi kislinami, z namenom iskanja novih terapevtskih pristopov.

6 LITERATURA

1. Debeljak A, Triller N, Kecelj P, Pompe-Kirn V, Rott T, Osolnik K in sod.: Strokovna izhodišča za internistično obravnavo bolnika s pljučnim rakom. Zdravniški vestnik 2002; 71: 385-90.
2. Global burden of cancer.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (9. 4. 2010).
3. Rak v Sloveniji 2007. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2010.
4. Rott T: Epidemiologija, etiopatogeneza in histološka klasifikacija pljučnih tumorjev. Medicinski razgledi 2002; 41: 289–312.
5. Debeljak A: Zgodnja diagnostika začetnih oblik pljučnega raka. Zdravniški vestnik 2005; 74: 717-20.
6. Terčelj M: Zgodnje odkrivanje pljučnega raka. Radiology and oncology 2006; 40: 59-66.
7. An introduction to lung cancer. <http://cancergrace.org/lung/2010/04/05/an-introduction-to-lung-cancer/> (15. 4. 2010).
8. Lung cancer. The Immune Recovery Clinic of the Immune Recovery Foundation
<http://www.immunerecovery.net /Lung%20Cancer.htm> (15. 4. 2010).
9. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY in sod.: Multi-institutional randomized phase II trial of Gefitinib for previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. Journal of Clinical Oncology 2003; 12: 2237-46.
10. Ginsberg R, Roth J, Fergusson M: Lung cancer surgical practice guidelines. Society of Surgical Oncology practice guidelines. Oncology (Huntington) 1997; 11: 889-92.

11. Mashima T, Seimiya H, Zsuruo T: De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *British Journal of Cancer* 2009; 100: 1369-72.
12. Kuhajda FP: Fatty acid Synthase and Cancer: New application of an old pathway. *Cancer Research* 2006; 66: 5977-80.
13. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ: Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *Journal of Lipid Research* 2002; 43: 1997-2006.
14. Bilač Krašnja M, Černe D: Optimizacija analiznega postopka merjenja aktivnosti lipoproteinske lipaze v rakavem tkivu. *Farmacevtski vestnik* 2009; 60: 21-26.
15. Trošt Z, Marc J, Sok M, Černe D: Increased apolipoprotein E gene expression and protein concentration in lung cancer tissue do not contribute to the clinical assessment of non-small cell lung cancer patients. *Archives of Medical Research* 2008; 39: 663-667.
16. Hughes-Fulford M, Chen Y, Tjandrawinata RR: Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis* 2001; 5: 701-7.
17. Krieger M: The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Current opinion in lipidology* 1997; 8: 275-80.
18. Plüddemann A, Neyen C, Gordon S: Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* 2007; 43: 207-17.
19. Moncur JT, Park JP, Memoli VA, Mohandas TK, Kinlaw WB: The "Spot 14" gene resides on the telomeric end of the 11q13 amplicon and is expressed in lipogenic breast cancers: implications for control of tumor metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6989-94.
20. Smith S: The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB* 1994; 8: 1248-59.

21. FASN gene.
http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id_type=entrezgene&id=2194 (6. 5. 2010).
22. Fatty acid synthase. http://en.wikipedia.org/wiki/Fatty_acid_synthase (6. 5. 2010).
23. Brink J, Ludtke SJ, Yang CY, Gu ZW, Wakil SJ, Chiu W: Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. PNAS USA 2002; 99: 138-43.
24. Chirala SS, Jayakumar A, Gu ZW, Wakil S.J: Human fatty acid synthase: Role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. PNAS USA 2001; 98: 3104-8.
25. FASN. <http://en.wikipedia.org/wiki/FASN> (6. 5. 2010).
26. Menendez J, Lupu R: Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nature Reviews Cancer 2007; 7: 763-77.
27. Menendez JA, Vazquez-Martin A, Ortega FJ, Fernandez-Real JM: Fatty acid synthase: association with insulin resistance, type 2 diabetes, and cancer. Clinical Chemistry 2009; 55: 425-38.
28. Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ in sod.: The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. Cancer Cell 2004; 5: 253-61.
29. Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G: Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. Current opinion on clinical nutrition and metabolic care 2006; 9: 358-65.
30. Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA: Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. PNAS USA 2000; 7: 3450-54.

31. Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF: Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Research* 1998; 58: 4611-15.
32. Zhou W, Han WF, Landree LE in sod.: Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells. *Cancer Research* 2007; 67: 2964-71.
33. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK in sod.: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, France: IARC Press; 2004.
34. Sobin LH, Wittekind C: TNM Classification of Malignant Tumors. 6 th ed Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2002.
35. Ginzinger DG: Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 2002; 30: 503-12.
36. Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000; 25: 169-93.
37. Mackay IM: Real-time PCR in microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection* 2004; 10: 190-212.
38. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 56-8.
39. Applied Biosystems 2008. TaqMan RT-PCR assay. Leiden, ServiceXS
<http://www.servicexs.com/servicexs+is+powered+by/applied+biosystems/taqman+rt-pcr+assay/> (26. 5. 2010)
40. Černe D: Lipoprotein lipase activity and gene expression in lung cancer and in adjacent noncancer lung tissue. *Experimental lung research* 2007; 33: 217-25.

41. Haaland CM, Heaphy CM, Butler KS, Fischer EG, Griffith JK, Bisoffi M: Differential gene expression in tumor adjacent histologically normal prostatic tissue indicates field cancerization. *International journal of Oncology* 2009; 35: 537-46.
42. Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimburger DC, Grizzle WE: The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Human pathology* 2000; 31: 1068-73.
43. Orita H, Coulter J, Tully E in sod.: Inhibiting fatty acid synthase for chemoprevention of chemically induced lung tumours. *Clinical Cancer Research* 2008; 14: 2458-64.
44. Wang Y, Zhang X, Tan W, Fu J, Zhang W: Significance of fatty acid synthase expression in non-small cell lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2002; 24: 271-73.
45. Wang Y, Zhang X, Tan W, Fu J, Zhang W: Prognostic value of expression of FASE, Her-2/neu, bcl-2 and p53 in stage I non-small cell lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004; 26: 369-72.
46. Visca P, Sebastiani V, Botti C, Diodoro MG, Lasagni RP, Romagnoli F, Brenna A, De Joannon BC, Donnorso RP, Lombardi G, Alo PL: Fatty acid synthase (FAS) is a marker of increased risk of recurrence in lung carcinoma. *Anticancer research* 2004; 24: 4169-73.