

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**JASNA MEŠKO**

**DIPLOMSKA NALOGA**

**PREUČEVANJE EKSPRESIJE GENA ZA FOLATNI RECEPTOR  $\beta$   
V NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM RAKAVEM TKIVU**

**UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**Ljubljana, 2011**

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**JASNA MEŠKO**

**DIPLOMSKA NALOGA**

**PREUČEVANJE EKSPRESIJE GENA ZA FOLATNI RECEPTOR  $\beta$   
V NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM RAKAVEM TKIVU**

**STUDY OF FOLATE RECEPTOR  $\beta$  GENE EXPRESSION  
IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER TISSUE**

**UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**Ljubljana, 2011**

Diplomsko naloge 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. Zahvaljujem se tudi Evi Vran, ki me je uvajala v delo na aparatu za PCR v realnem času ter Anji Lenardič za slovnično popravo diplomske naloge.

Posebno se zahvaljujem staršem, ki so mi omogočili študij in me pri tem podpirali, svojemu fantu Samotu ter vsem sošolcem in prijateljem, ki so naredili moja študentska leta napozabna in polna lepih spominov.

## **IZJAVA**

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

Jasna Meško

Ljubljana, oktober 2011

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Član komisije: doc. dr. Tomaž Vovk

# KAZALO VSEBINE

<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>I</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>III</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>IV</b>
<b>POVZETEK.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>PLJUČNI RAK.....</i>	1
1.1.1    Epidemiologija pljučnega raka .....	1
1.1.2    Etiologija in dejavniki tveganja pljučnega raka .....	1
1.1.3    Histološka razvrstitev in patološke značilnosti pljučnih tumorjev .....	2
1.1.4    TNM klasifikacija.....	4
1.2 <i>TUMORSKI MAKROFAGI.....</i>	6
1.2.1    Rak kot vnetna bolezen .....	6
1.2.2    Razvoj in aktivacija makrofagov .....	6
1.2.3    Karcinogeno delovanje tumorskih makrofagov M2 .....	7
1.3 <i>MEHANIZMI PRESKRBE CELIC S FOLATOM .....</i>	10
1.3.1    Presnova folata.....	10
1.3.2    Sistemi za privzem folatov v celice.....	12
1.3.2.1. <i>Distribucija folatnih receptorjev v normalnih in rakavih tkivih.....</i>	13
1.3.2.2. <i>Modulacija izražanja in funkcionalnost folatnih receptorjev.....</i>	14
1.3.2.3. <i>Folatni receptor β in njegova povezava s tumorskimi makrofagi .....</i>	17
1.3.2.4. <i>FRβ kot tarča protitumornih učinkovin in dostavnih sistemov.....</i>	18
<b>2 NAMEN DELA.....</b>	<b>20</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>21</b>
3.1 <i>Vzorci .....</i>	21
3.2 <i>Materiali in aparature .....</i>	21
3.3 <i>Verižna reakcija s polimerazo v realnem času .....</i>	22

3.3.1	Princip metode .....	22
3.3.2	Načini detekcije .....	24
3.3.3	Potek reakcije PCR v realnem času .....	26
3.3.4	Analiza rezultatov.....	27
3.4	<i>Zanesljivost postopka in priporočila</i> .....	28
3.5	<i>Uporabljene statistične analize</i> .....	29
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>30</b>
4.1	<i>Klinični podatki o bolnikih</i> .....	30
4.2	<i>Rezultati meritev izražanja gena FOLR2</i> .....	31
4.2.1	Izražanje gena <i>FOLR2</i> v tumorskem in kontrolnem tkivu .....	33
4.2.2	Korelacija med izražanjem gena <i>FOLR2</i> v tumorskem in kontrolnem tkivu .....	35
4.2.3	Izražanje gena <i>FOLR2</i> v različnih stadijih bolezni .....	35
4.2.4	Izražanje gena <i>FOLR2</i> v različnih histoloških tipih.....	37
4.2.5	Izražanje gena <i>FOLR2</i> in izguba telesne teže.....	38
4.2.6	Izražanje gena <i>FOLR2</i> in kajenje .....	39
4.2.7	Izražanje gena <i>FOLR2</i> in preživetje.....	39
4.2.8	Prognostičen pomen izražanja <i>FOLR2</i> v tumorskem tkivu.....	42
4.2.9	Povezava med izražanjem <i>FOLR2</i> in drugimi geni v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu .....	42
<b>5</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>44</b>
	<b>LITERATURA .....</b>	<b>45</b>

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Histološki tipi pljučnega raka.....	3
<b>Slika 2:</b> Razvoj in diferenciacija makrofagov ter njihove glavne funkcije.....	7
<b>Slika 3:</b> Karcinogeno delovanje tumorskih makrofagov M2.....	9
<b>Slika 4:</b> Pomembne biokemične reakcije v katerih sodeluje folat .....	11
<b>Slika 5:</b> Model povezave med intracelularno koncentracijo folata in ravnjo izražanja FR $\alpha$ . .....	16
<b>Slika 6:</b> Mehanizem delovanja ATRA na izražanje FR $\beta$ .....	17
<b>Slika 7:</b> Pozicija gena <i>FOLR2</i> na kromosomu 11.....	17
<b>Slika 8:</b> Prikaz krivulje jakosti fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri PCR v realnem času .....	24
<b>Slika 9:</b> Princip delovanja PCR v realnem času s sondo TaqMan.....	25
<b>Slika 10:</b> Statistična analiza izražanja <i>FOLR2</i> v tumorskem in kontrolnem tkivu.....	34
<b>Slika 11:</b> Statistična analiza izražanja <i>FOLR2</i> v različnih stadijih tumorskega tkiva. ....	36
<b>Slika 12:</b> Statistična analiza izražanja <i>FOLR2</i> v tumorskem tkivu živih in pokojnih bolnikov.....	40
<b>Slika 13:</b> Statistična analiza izražanja <i>FOLR2</i> v kontrolnem tkivu živih in pokojnih bolnikov.....	41

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Značilnosti histoloških tipov pljučnih rakov.....	3
<b>Preglednica II:</b> Določanje razširjenosti (stadija) bolezni po sistemu TNM.....	4
<b>Preglednica III:</b> Sestavine in njihovi volumni za MM pufer.....	26
<b>Preglednica IV:</b> Sestavine in njihovi volumni, ki so poleg MM pufra še potrebni pri PCR v realnem času.....	26
<b>Preglednica V:</b> Klinične značilnosti in laboratorijski rezultati bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom.....	30
<b>Preglednica VI:</b> Rezultati meritev Ct tarčnega gena <i>FOLR2</i> , hišnega gena <i>GUS</i> , normalizacija <i>FOLR2</i> , relativno izražanje <i>FOLR2</i> ter razmerje <i>FOLR2</i> v kontrolnem in tumorskem tkivu.....	31
<b>Preglednica VII:</b> Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena <i>FOLR2</i> v tkivu.....	33
<b>Preglednica VIII:</b> Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena <i>FOLR2</i> v tumorskem tkivu glede na stadij bolezni.....	36
<b>Preglednica IX:</b> Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena <i>FOLR2</i> v tumorskem tkivu glede na histološki tip.....	37
<b>Preglednica X:</b> Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena <i>FOLR2</i> v tumorskem tkivu glede na izgubo telesne teže.....	38
<b>Preglednica XI:</b> Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena <i>FOLR2</i> v tumorskem tkivu glede na kajenje.....	40
<b>Preglednica XII:</b> Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena <i>FOLR2</i> v tumorskem tkivu pri živih in pokojnih.....	41
<b>Preglednica XIII:</b> Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena <i>FOLR2</i> v kontrolnem tkivu pri živih in pokojnih.....	42

## **POVZETEK**

Rak je vnetni proces in makrofagi, kot vnetne celice na mestu tumorja, imajo v njem nepogrešljivo vlogo. Makrofagi se pod vplivom tumorskih dejavnikov spremenijo in postanejo t.i. tumorski makrofagi, ki imajo pretežno fenotip M2. Ti imajo pro-tumorsko delovanje in sodelujejo v razvoju in napredovanju tumorja. *FOLR2* kodira folatni receptor  $\beta$ , ki se značilno povišano izraža v makrofagih M2. Folatni receptor  $\beta$  z endocitozo prenaša folate v celico in tako posredno sodeluje v procesih celične rasti, razvoja in delitve.

V okviru diplomske naloge smo proučevali izražanje *FOLR2* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu in sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu istih bolnikov. Glede na že izvedene raziskave smo predvidevali, da je izražanje *FOLR2* više v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu kot v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika, saj smo predvidevali, da je v tumorskem tkivu več tumorskih makrofagov M2, ki bodo povišali izražanje *FOLR2*. Poleg tega smo pričakovali tudi, da je izražanje gena *FOLR2* povezano vsaj s katerim od opazovanih kliničnih podatkov bolnikov: stadij bolezni, histološki tip tumorja, starost, spol, izguba telesne teže bolnikov, število let kajenja, 4-letno preživetje.

Z uporabo metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času smo izmerili izražanje *FOLR2* v rakavem in v sosednjem nerakavem tkivu 40 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Izražanje *FOLR2* je bilo za 32 % večje v rakavem kot v nerakavem tkivu (mediana 2,32 vs. 1,76), vendar razlika ni bila statistično signifikantna ( $p = 0,1181$ ). Izražanje *FOLR2* v rakavem in sosednjem nerakavem tkivu ni bilo povezano z nobenim od opazovanih kliničnih podatkov ter ni imelo prognostičnega pomena. Ugotovili smo tudi, da izražanje *FOLR2* korelira z izražanjem nekaterih genov povezanih z makrofagi M2 (*CD163, SRA1*) ter, da izražanje *FOLR2* korelira tudi z izražanjem nekaterih genov povezanih z ostalimi stromalnimi celicami, pa tudi tumorskimi celicami. To bi lahko pomenilo, da se *FOLR2* izraža tudi v nekaterih drugih celicah, ne le v makrofagih M2.

Iz naših raziskav bi težko potegnili enostranske zaključke, saj bi za potrditev naših razmišljaj morali nadaljevati raziskave na celičnem nivoju, vzporedno pa bi morali raziskovati tudi funkcionalnost folatnih receptorjev, saj ni nujno, da je izražen protein tudi funkcionalno aktiven.

## ABSTRACT

Cancer is an inflammatory process and macrophages, as inflammatory cells in the location of a tumor, play a key role in it. Macrophages mutate under the influence of tumor factors and become the so-called tumor associated macrophages with a predominately M2 phenotype. These have a pro-tumor effect and assist in tumor development and progression. *FOLR2* encodes for the folate receptor  $\beta$  and express itself characteristically elevated in macrophages M2. The folate receptor  $\beta$  carries the folates into the cell via endocytosis and thus indirectly cooperates in the processes of cell growth, development and division.

Within the framework of the diploma thesis, we studied the expression of *FOLR2* in non-small cell cancerous lung tissue and the adjoining seemingly healthy lung tissue of the same patients. Regarding the already performed research, we anticipated that the expression of the *FOLR2* is higher in tumor than in the adjoining non-tumor tissue of the same patient, for we anticipated that there are more tumor associated M2 macrophages in the tumor tissue which will elevate the *FOLR2* expression. Furthermore, we also expected the expression of the *FOLR2* gene to be connected to at least some of the patients observed clinical records: stage of disease, histological type of tumor, age, sex, loss of body weight, years of smoking, a 4-year survival rate.

With the use of real time polymerase chain reaction, we measured the expression of the *FOLR2* in tumor and the adjoining non-tumor tissue in 40 patients with non-small cell lung cancer. The expression of the *FOLR2* was 32 % higher in the tumor than in non-tumor tissue (median 2,32 vs. 1,76), however the difference was not statistically significant ( $p = 0.1181$ ). The expression of the *FOLR2* in the tumor and the adjoining non-tumor tissue was not connected with any of the observed clinical records and did not have any prognostic meaning. We also established that expression of *FOLR2* correlates with expression of some genes connected with macrophages M2 (*CD163*, *SRA1*) and that it correlates with expression of some genes connected with other stromal and tumor cells. This could mean that *FOLR2* also expresses itself in other cells, not only in macrophages M2. To confirm our deliberations we would have to continue our research on a cellular level and simultaneously research the functionality of the folate receptors, because it is not necessary that the expressed protein is also functionally active.

## SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen
Ap-1	aktivator protein 1; transkripcijski faktor
ATRA	trans retinojska kislina (ang. all trans retinoic acid)
CSF	kolonije spodbujajoči faktor
cDNK	komplementarna DNK
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
DHF	dihidrofolat
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EGF	epidermalni rastni faktor
ets	ets transkripcijski faktor
FASN	sintaza višjih maščobnih kislin
FR	folatni receptor
<i>FOLR2</i>	gen za folatni receptor $\beta$
GM-CSF	granulocitno makrofagne kolonije spodbujajoči faktor
GPI	glikozilfosfatidilinozitol
GUS	$\beta$ -glukoronidaza
hnRNP E1	heterogeni nuklearni ribonukleoprotein E1
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$
IL	interlevkin
LDL	lipoprotein z nizko gostoto
LPL	lipoproteinska lipaza
LPS	lipopolisaharidi
M-CSF	makrofagne kolonije spodbujajoči faktor
MMP-9	matriks metalopeptidaza 9
mRNK	informacijska ribonukleinska kislina
NF- $\kappa$ B	nuklearni faktor $\kappa$ B
NSCLC	nedrobnocelični pljučni rak (ang. non-small cell lung cancer)
PEG	polietilenglikol
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
Pol II	RNK polimeraza II

<b>Okrajšava</b>	<b>Pomen</b>
RAR	receptor retinojske kisline (ang. retinoic acid receptor)
RNaza	ribonukleaza
RNK	ribonukleinska kislina
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
SD	standardna deviacija
sFBP	topni folat-vezoči proteini (ang. soluble folate binding proteins)
Sp1	protein specifičnosti 1; transkripcijski faktor
SRA1	steroidni receptor RNK aktivator 1
SREBP1 in SREBP2	od sterola odvisen regulatorni element vezajoči protein 1 in 2
TGF-β	transformirajoči rastni dejavnik β
THF	tetrahidrofolat
TNF-α	tumorje-nekrotizirajoči faktor α
TNM klasifikacija	mednarodna klasifikacija rakavih obolenj (ang. TNM = "Tumor Node Metastasis")
uPA	urokinazni plazminogenski aktivator
VEGF	vaskularni endoteljski rastni faktor
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (ang. World health organization)

# 1 UVOD

## 1.1 PLJUČNI RAK

### 1.1.1 Epidemiologija pljučnega raka

Pljučni rak je najpogosteša 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 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 aromatični ogljikovodiki kot iniciatorji kancerogeneze (npr. benzpiren, dibenzantracen), ki povzročijo mutacije in s tem trajno okvaro DNK, 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, biklorometil eter 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). Le 1–3 % pljučnega raka naj bi nastalo zaradi nepoklicne izpostavljenosti onesnaženemu zraku. Pomembna je izpostavljenost radonu in razpadnim produktom v zaprtih, dobro izoliranih 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, kovinska tuja telesa.

Pomembna je presnova kancerogenov, njihova odstranitev ali pretvorba v aktivno obliko. Strastni kadilci, ki ne zbolijo za pljučnim rakom, verjetno niso sposobni presnavljati kancerogenov v delajoče 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 oblici pljučnega raka, ki jih potrdimo na osnovi citološke in/ali histološke preiskave odvezetih tumorskih celic in tkiv sta **drobnocelični** (15–25 %) in **nedrobnocelični** (75–85 %) rak pljuč. Imeni ne opisujeta velikosti tumorja, ampak govorita o oblici 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.

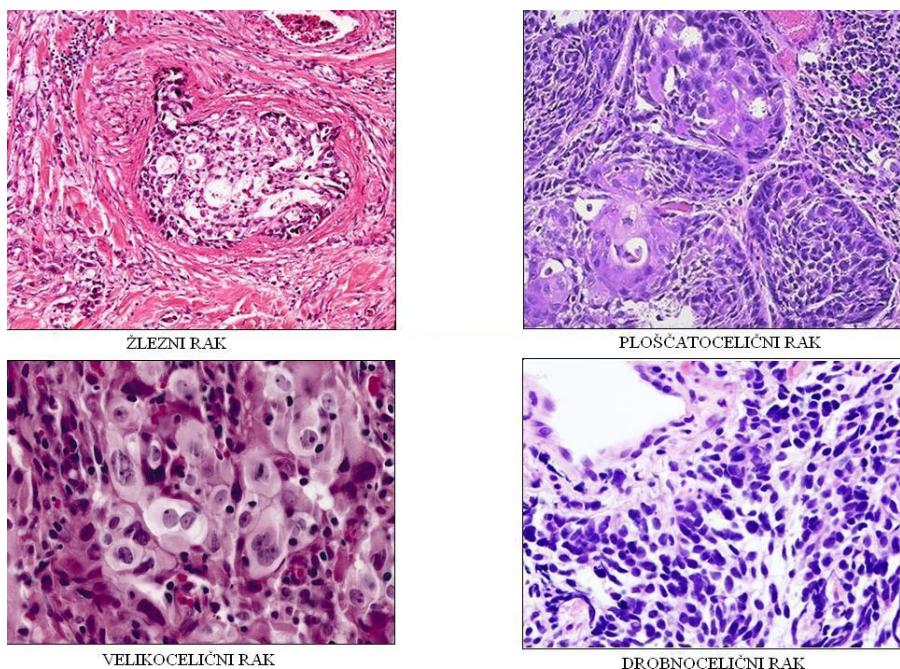
Najpogostejsa oblika raka na pljučih je **nedrobnocelični** rak pljuč. Takšno obliko raka ima preko 75 % vseh bolnikov s pljučnim rakom. Glede na citološko in histološko sliko delimo nedrobnocelični rak pljuč na naslednje oblike:

- 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 makroceliularni karcinom (najpogosteje ga odkrijemo kot relativno veliko spremembo v obrobnem 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 tumorji 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 (oblika žleznegra), 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 (7).

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 prognostični 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, 3 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.
To	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. obstrukcijski 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 plevrálni 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	Zasevi 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 ozdravljen 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 TUMORSKI MAKROFAGI

### 1.2.1 Rak kot vnetna bolezen

Razmišljanje, da je vnetje vzrok za nastanek raka, sega že v leto 1850, ko so ugotovili, da lahko kronično vnetje sproži nastanek raka (11). Danes vemo, da več kot 15 % tumorjev izvira iz mest kroničnega vnetja ali infekcije (12). Prav gotovo je najbolj poznana vloga Helicobacter pylori pri raku želodca in vloga HPV virusov pri raku materičnega vratu (13, 14). Tudi kemijske snovi, ki kronično dražijo sluznico dihalnega trakta (azbest, cigaretni dim), ključno prispevajo k razvoju bronhialnega raka (15).

Iskanje povezav med vnetnimi procesi in pojavnostjo raka, je privedlo do spoznanja, da imajo prav makrofagi, kot vnetne celice na mestu vnetja, nepogrešljivo vlogo v razvoju in napredovanju tumorja (16, 17).

### 1.2.2 Razvoj in aktivacija makrofagov

Ko monociti prispejo v različna tkiva, se preobrazijo v makrofage, ki opravljam številne imunološke funkcije. M-CSF (makrofagne kolonije spodbujajoči faktor) je glavni regulator diferenciacije, proliferacije in preživetja mononuklearnih fagocitov, ima pa tudi pomembno vlogo pri aktivaciji razvojne vrste makrofagov M2 (18).

Makrofagi se razvojno delijo v dve glavni vrsti (19):

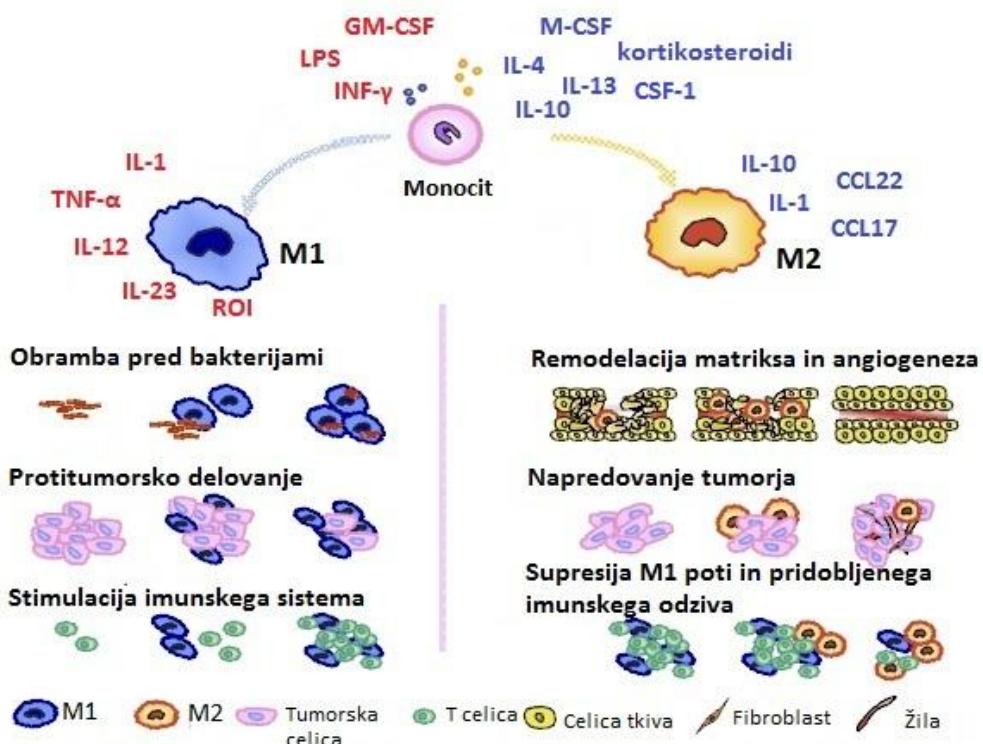
- **makrofagi M1** (klasična pot aktivacije), ki aktivirajo Th1 imunski odziv,
- **makrofagi M2** (alternativna pot aktivacije), ki aktivirajo Th2 imunski odziv. Ti se delijo še na tri podvrste. Glede na dejavnike, ki jih aktivirajo poznamo makrofage M2a, M2b in M2c (20).

Diferenciacija makrofagov v obe glavni vrsti je predstavljena na Sliki 2.

Makrofagi M1 nastanejo pod vplivom INF- $\gamma$  (interferon gama) ali LPS (lipopolisaharidi) iz zunanje celične membrane Gram negativnih bakterij. Nato izločajo IL-12, IL-23 in druge citokine, ki stimulirajo Th1 imunski odziv. Ta deluje citotoksično na fagocitirane mikroorganizme in neoplastične celice, poveča pa se tudi predstavljanje antigenov na površini antigen predstavitev celic. Ker makrofagi M1 sproščajo encim inducibilno NO-sintazo (iNOS) se poveča nastajanje reaktivnih dušikovih in kisikovih radikalov (21).

Nasprotno makrofagi M2 nastanejo pod vplivom IL-4, IL-13, IL-10, M-CSF in glukokortikoidov. Značilnost makrofagov M2 je visoko izražanje IL-10, izločanje CCL17

(kemokin ligand 17) in CCL22 (kemokin ligand 22), visoko izražanje manoze, arginaze I in II, odstranjevalnih receptorjev ter slaba predstavitevna sposobnost antigena (21). Tudi izražanje CSF-1 (kolonije spodbujajoči faktor) je v tumorskem tkivu signifikantno višje kot v zdravem tkivu, kar kaže na to, da je tudi CSF-1 odgovoren za razvoj makrofagov v smer M2 (23). Makrofagi M2 tako promovirajo angiogenezo, remodelacijo in izgradnjo poškodovanega matriksa, prav tako pa zmanjšujejo M1 posredovane funkcije in tako inhibirajo Th1 imunski odziv (24).



**Slika 2:** Razvoj in diferenciacija makrofagov ter njihove glavne funkcije (22).

Razlaga pojmov: GM-CSF (granulocitno makrofagne kolonije spodbujajoči faktor), LPS (lipopolisaharidi), INF-gama (interferon gama), IL (interlevkin), TNF-alfa (tumorje-nekrotizirajoci faktor  $\alpha$ ), ROI (reaktivni kisikovi radikali), M-CSF (makrofagne kolonije spodbujajoči faktor), CSF-1 (kolonije spodbujajoči faktor), CCL (kemokin ligand).

### 1.2.3 Karcinogeno delovanje tumorskih makrofagov M2

Makrofage, ki pridejo na mesto tumorja, imenujemo tumorski makrofagi in predstavljajo več kot 50 % tumorske mase. Tumorski makrofagi niso homogena skupina. Lahko imajo fenotip M1 ali M2, našli pa so tudi tumorske makrofage, ki izkazujejo mešani fenotip, saj izražajo tako provnetni IL-12, kot imunosupresivni IL-10 (21, 25). Praviloma je prisotnih

več makrofagov tipa M2, kar so potrdili tudi pri NSCLC, saj so z imunohistološko študijo ugotovili, da je bilo 70 % makrofagov M2 in 30 % makrofagov M1 (26).

Kot markerje pri takih raziskavah uporabljamo monoklonska protitelesa, saj levkociti na svojih površinah izražajo molekule, ki jih je mogoče zanesljivo in preprosto določiti. Ta monoklonska protitelesa so sistematizirana po razvrstitvi CD (Cluster of differentiation). Na splošno za makrofage uporabljamo CD68, za makrofage M1 različne antigene za celične receptorje, ki jih najdemo na makrofagih M1 (tak receptor je npr. HLA-DR), za makrofage M2 pa predvsem CD163 (23, 26). To je membranski protein iz družine odstranjevalnih receptorjev, deluje kot endocitozni receptor za hemoglobin-haptoglin kompleks (27) in se visoko izraža na makrofagih M2. Makrofagi M1 so torej CD68+/HLA-DR+, makrofagi M2 pa CD68+/CD163+.

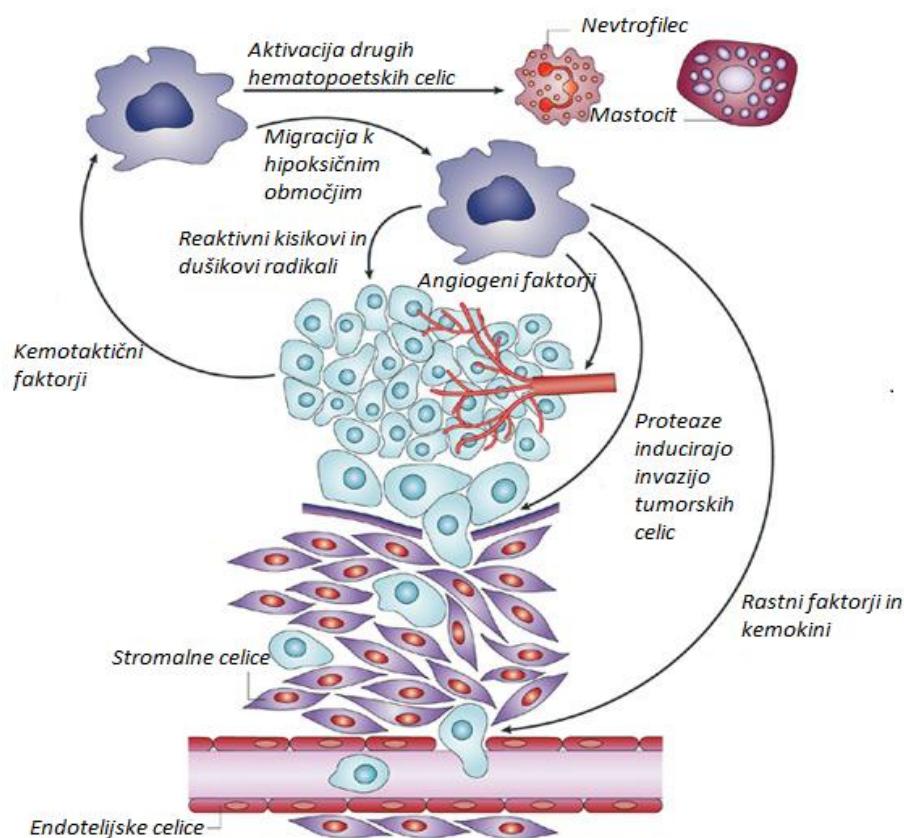
Na mestih kroničnega vnetja najdemo predvsem makrofage M1. Ti zaradi sproščanja vnetnih citokinov in številnih radikalov čez daljše časovno obdobje povzročijo poškodbo tkiva, mutacije na molekuli DNK, inhibirajo pa tudi delovanje tumor supresorskega gena p53 v okoliških epitelnih celicah. Tako postanejo celice na mestih kroničnega vnetja predispozirane za maligno transformacijo (16, 17). Makrofagni fenotip se lahko hitro spremeni iz M1 do M2. Najpomembnejši transkripcijski faktor, ki povečuje provnetni odziv makrofagov je NF- $\kappa$ B (nuklearni faktor  $\kappa$ B), ki povečuje izražanje provnetnih citokinov in drugih molekul, kot odgovor na različne okolijske dražljaje (stresni signali, vnetni citokini, patogeni, hipoksija). Aktivacija NF- $\kappa$ B je odvisna od stopnje tumorske rasti. V vnetnih tkivih in v zgodnjem obdobju kancerogeneze je aktiviran, v tumorskem tkivu pa se inaktivira, zato začnejo prevladovati imunosupresivni signali (28).

Razvoj tumorskih makrofagov pretežno v smer fenotipa M2 je posledica odsotnosti M1 orientiranih signalov (INF- $\gamma$ , LPS) in izražanja M2 faktorjev (IL-4, IL-13, IL-10, CSF-1, M-CSF). Ti makrofagi promovirajo preživetje, proliferacijo in metastaziranje tumorskih celic (24).

Infiltracija makrofagov v tumorsko tkivo se začne že v zelo zgodnji stopnji bolezni in se strmo povečuje tekom napredovanja tumorja. Na mesto tumorja pridejo pod vplivom različnih kemotaktičnih faktorjev. Tumorski makrofagi M2 se nabirajo v neožiljenih regijah tumorja, kjer sprožijo intenzivno vaskularizacijo tumorskega tkiva tako, da sintetizirajo in izločajo VEGF (vaskularni endotelijski rastni faktor), angiopoetina ANG1 in ANG2, privabljajo in aktivirajo pa tudi druge hematopoetske celice – nevtrofilce in mastocite, ki opravljam podobne naloge (29, 30). Tumorski makrofagi M2 izločajo tudi

proteaze (uPA, MMP-9, katepsine), ki so ključni akterji v metastaziranju tumorskih celic, saj so odgovorni za razgradnjo in remodelacijo zunajceličnega matriksa (31, 32). Tudi številni rastni faktorji in kemokini (EGF, TGF- $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ ) prispevajo k migraciji tumorskih celic, prav tako pa dajejo proliferativne in anti-apoptozne signale neoplastičnim celicam (33, 34).

Celotno pro-tumorsko delovanje tumorskih makrofagov M2 nam nazorno prikazuje Slika 3.



**Slika 3:** Karcinogeno delovanje tumorskih makrofagov M2 (35).

Heterogenost tumorskih makrofagov lahko razloži dejstvo, da imamo nasprotujoče si rezultate kliničnih študij, ki ugotavljajo korelacijo med številom tumorskih makrofagov in prognozo oz. preživetjem bolnikov. Chen ugotavlja negativno korelacijo med številom tumorskih makrofagov in preživetjem NSCLC bolnikov (36), nasprotno Welsh ugotavlja pozitivno korelacijo (37). V raziskavi kjer so posebej merili število makrofagov M1 in M2 so ugotovili, da večja kot je gostota makrofagov M1 tako v tumorskih kot v stromalnih

celicah, večje je preživetje bolnikov z NSCLC. Za makrofage M2 niso ugotovili signifikantne razlike (26).

Prav tako visoko število tumorskih makrofagov v neožiljenih regijah tumorja pozitivno korelira z večjo angiogenezo pri raku dojke, kar kaže na M2 fenotip teh makrofagov (38). Nasprotno pa število tumorskih makrofagov v dobro ožiljenih regijah tumorja korelira z dobro prognozo, kar kaže na antitumorski fenotip (M1) makrofagov na teh mestih (39).

Danes gredo raziskave v smer določevanja genov, ki se tipično ekspresirajo v tumorskih makrofagih M2. Ti bi lahko v prihodnosti bili pomembna tarča protitumorskih zdravil. Najboljša tarča bi bil protein, ki se prekomerno izraža samo na tumorskih makrofagih M2 in ne v sosednjih zdravih tkivih.

### 1.3 MEHANIZMI PRESKRBE CELIC S FOLATOM

Folna kislina (ali folacin) in folat (oblika prisotna v naravi) sta vodotopni oblici vitamina B<sub>9</sub>. Ime izhaja iz latinske besede folium, kar pomeni list. Listnata zelenjava je tudi glavni vir folne kisline v prehrani.

Folna kislina je pomembna pri številnih procesih v človeškem organizmu – pri sintezi, popravljanju in metilaciji DNK, poleg tega sodeluje kot koencim pri biokemijskih reakcijah v telesu, kjer se prenašajo skupine z enim ogljikovim atomom. Še posebej pomembna je pri hitrih celičnih delitvah in rasti v nosečnosti in otroštvu. Številne raziskave kažejo tudi njeno pomembno vlogo pri razvoju rakavih obolenj, zato so folna kislina, folati ter sistemi za privzem folatov v celice postali predmet številnih raziskav (40).

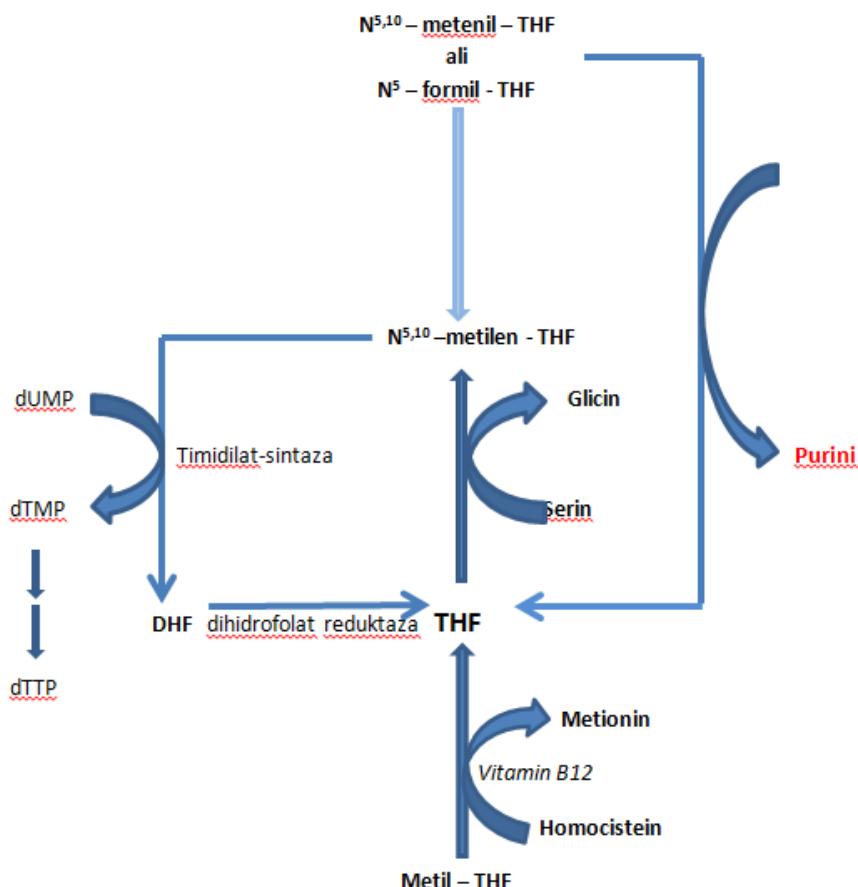
#### 1.3.1 Presnova folata

Folna kislina se nahaja v zeleni listnati zelenjadi, kvasu, jetrih ter gobah. Folati so v različnih hranilih konjugirani z verigo glutaminskih ostankov, ki so polarni in s tem preprečujejo intestinalno absorpcijo folatov. Konjugaze ( $\gamma$ -glutamil karboksipeptidaze) v lumnu ter epitelijskih celicah prebavne cevi cepijo poliglutamate v mono- in diglutamate, ki se lahko absorbirajo v duodenumu ter proksimalnemu delu jejunuma.

Folat sodeluje v številnih pomembnih biokemičnih reakcijah prikazanih na Sliki 4. V plazmi se pojavlja večinoma v obliki monoglutamata, N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolata (metil-THF), ki je razen v plazmi prisoten še v mleku ter ostalih telesnih tekočinah. Ko prispe v celice, se N<sup>5</sup>-metilna skupina odstrani v reakciji, pri kateri sodeluje kobalamin (vitamin B<sub>12</sub>), nastane pa folat, ki se preobrazi nazaj v poliglutamatno obliko. Ta oblika zadržuje folat v celici.

Normalno je v človeku za 2-4 mesece zalog folne kisline v različnih delih telesa, od tega polovica v jetrih, zato se njegovo pomanjkanje v hrani na začetku kompenzira iz zalog in se klinično pokaže šele čez nekaj mesecev.

Tetrahidrofolati delujejo kot koencimi v procesih prenosa 1-C atomskih skupin različnim organskim spojinam. Vir atomskih skupin 1-C je ponavadi serin, ki v reakciji s THF proizvaja glicin ter N<sup>5,10</sup>-metilen-THF. Najbolj pomembni produkti tega prenosa atomskih skupin 1-C so purini, dNTP in metionin. Pri tem nastaja DHF, ki ga encim dihidrofolat reduktaza pretvarja nazaj v THF.



**Slika 4:** Pomembne biokemične reakcije v katerih sodeluje folat (41).

Razlaga pojmov: metil-THF (N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolat), THF (tetrahidrofolat), DHF (dihidrofolat), dUMP (deoksiuridin monofosfat), dTMP (deoksimidin monofosfat), dTTP (deoksimidin trifosfat).

Klinična posledica pomankanja folata je anemija, nujen pa je tudi za formacijo živčnega sistema med fetalno in neonatalno dobo. V primeru pomanjkanja vitamina B<sub>12</sub> ostane folat ujet v obliki metil-THF, kar ovira potek reakcij, v katerih sodeluje (41).

### 1.3.2 Sistemi za privzem folatov v celice

Evkariotske celice nimajo mehanizmov za biosintezo folata, zato morajo le tega dobiti s hrano. Pri človeku obstajajo zapleteni homeostatski mehanizmi, ki zagotavljajo ustrezен privzem folatov v intracelularni prostor. Obstajajo trije glavni mehanizmi za prenos folatov v celice, ki so lahko prisotni na isti celici:

- I. **Reduciran folatni prenašalec** (reduced folate carrier; RFC) je transmembranski prenašalec, ki ima visoko kapaciteto in nizko afiniteto za folate. Že samo ime pove, da je nezmožen vezati folno kislino (nefiziološko oksidirano obliko) in je prevladujoč prenašalec za folate (reducirane fiziološke oblike), saj se nahaja v vseh normalnih tkivih odraslega človeka (42).
- II. **S protoni sklopljen folatni prenašalec** je bil nedavno odkrit in je glavni prenašalec za folate v kislem okolju, pomemben pa je predvsem za intestinalno absorpcijo folatov. Najdemo ga tudi v možganih in horoidnem pletežu, kjer prenaša folate v centralni živčni sistem (43, 44).
- III. **Folatni receptorji** (FR) so glikopolipeptidi in imajo visoko afiniteto za folno kislino in fiziološko obliko folatov v telesu metil-THF. Folate prenašajo v citosol z endocitozo. Izražanje FR je omejeno na normalne diferencirane epitelijске celice, prekomeren pa se izražajo pri nekaterih vrstah raka, kjer so našli tudi mutirane oblike FR (45, 46).

V nadaljevanju se bomo osredotočili predvsem na FR, saj so le ti predmet našega raziskovanja.

Človeški FR so kodirani z družino genov, katerih produkti so FR $\alpha$ , FR $\beta$  in FR $\gamma$  (47, 48, 49). Četrta izoforma poimenovana  $\delta$  je bila nedavno odkrita in je o njej bolj malo znanega (50). Izoforme FR si delijo približno 70 % sekvenčne homologije (51). FR $\alpha$  in FR $\beta$  sta zasidrana na celično membrano z glikozil fosfatidilinozitolom (GPI) preko terminalnega karboksilnega ostanka. GPI sidrani proteini so obogateni s specifičnimi membranskimi mikrodomenami – lipidnimi rafti. Lipidni rafti so majhna, specializirana področja

membran, ki so sestavljeni iz holesterola in sfingolipidov (sfingomielina, glikosfingolipida) in proteinov v eksoplazmatskem delu dvosloja. Prekrivajo lahko tudi polovico celične površine in služijo kot platforma za prenos signala in kot enote za recikliranje proteinov med površino celice in endocitozno vsebino. FR $\gamma$  je sekretorni protein in se izloča (ni vezan na membrano celice) (45). FR $\alpha$  ima tri, FR $\beta$  pa dve potencialni mesti za N-glikolizacijo, ki lahko vpliva na aktivnost in funkcionalnost FR, saj vpliva na pravilno zvijanje proteina. V odsotnosti N-glikolizacije je samo 2 % FR $\alpha$  in 8 % FR $\beta$  izraženih na celični površini (52). FR $\alpha$  in FR $\beta$  imata tudi različno stereospecifičnost. FR $\alpha$  veže (S)-metil-THF s petdesetkratno večjo afiniteto kot FR $\beta$ . Vzrok je v aminokislinskih ostankih, ki se razlikujejo med temo dvema izoformama in ležijo blizu vezavnega mesta na receptorju. Funkcionalne razlike med dvema izoformama bi lahko izkoriščali pri načrtovanju novih selektivnih učinkovin in dostavnih sistemov, ki ciljajo samo FR $\beta$ , FR $\alpha$  pa ne (53).

#### *1.3.2.1. Distribucija folatnih receptorjev v normalnih in rakavih tkivih*

FR so sposobni transportirati folate v notranjost celice, vendar v tkivih odraslega človeka prevladujejo druge poti privzema folata. Večina normalnih tkiv nima FR (42).

FR $\alpha$  je najbolj pogosta oblika FR in se ponavadi nahaja na apikalni strani celic, kjer ni v neposrednem stiku s folati iz krvnega obtoka. Prisoten je na nekaterih normalnih epitelijskih celicah (horoidni pletež, proksimalni tubuli ledvic, jajcevodi, maternica, acinarne celice dojk, podčetljustna slinavka, bronhialne žleze, pnevmociti tipa I in II, trofoblasti v placenti) in na karcinomih epitelijskih celic (najbolj tipično raka jajčnikov in maternice) (54). FR $\alpha$  je na normalnih epitelijskih celicah sposoben vezave folata, vendar zaradi apikalne orientiranosti ne more vezati folatnih konjugatov, ki jih vnesemo intravenozno. Izjema so ledvice, kjer je FR $\alpha$  izražen na proksimalnih tubulih ledvic in veže folatne konjugate po glumerulni filtraciji. Zato moramo pri načrtovanju folatnih konjugatov, ki ciljajo FR $\alpha$ , z uporabo novejših dostavnih sistemov (liposomov, nanodelcev, makromolekul...) preprečiti glomerulno filtracijo takih učinkovin (55).

FR $\beta$  je prisoten na normalnih hematopoetskih celicah, v placenti, timusu in vranici ter v tumorjih ne-epiteljskega izvora, kot je mieloidna levkemija (56, 57, 58). FR $\beta$  na normalnih hematopoetskih celicah ni sposoben vezave folatov in je v neaktivni obliki, v nasprotju s sposobnostjo vezave le teh v placenti (59, 56).

FR $\gamma$  najdemo v normalnih in rakavih celicah hematopoetskega izvora, ki se nahajajo v vranici, kostnem mozgu in timusu ter raku jajčnikov, materičnega vratu in maternice (48, 49).

Kot že omenjeno, se FR nahajajo tudi v prosti obliki in kot taki niso vezani na membrano celice (soluble folate binding proteins; sFBP). Alfa in beta izoforme sFBP izvirajo iz membransko-asociiranega prekurzorja po delovanju različnih fosfolipaz ali proteaz. FR $\gamma$  pa je sekretorni protein in se vedno izloča. Najdemo jih v ekstracelularnih tekočinah, predvsem v mleku, cerebrospinalni tekočini, plodovnici in urinu kjer lahko vežejo in stabilizirajo folat, predvsem kadar gre za pomanjkanje folata v telesu. V serumu jih normalno ni, zato vsaka izoforma sFRP v serumu kaže na maligen proces (45, 60).

FR pa se ne nahajajo samo na površini celice, ampak jih je veliko tudi intracelularno, kjer njihova vloga ni dobro poznana. Lahko, da predstavljajo rezervoar iz katerega se imobilizirajo na površino ob povečanih potrebah celice po folatu, lahko pa imajo drugo, še nepoznano intracelularno funkcijo, ki ni povezana s transportom folatov (46).

#### *1.3.2.2. Modulacija izražanja in funkcionalnost folatnih receptorjev*

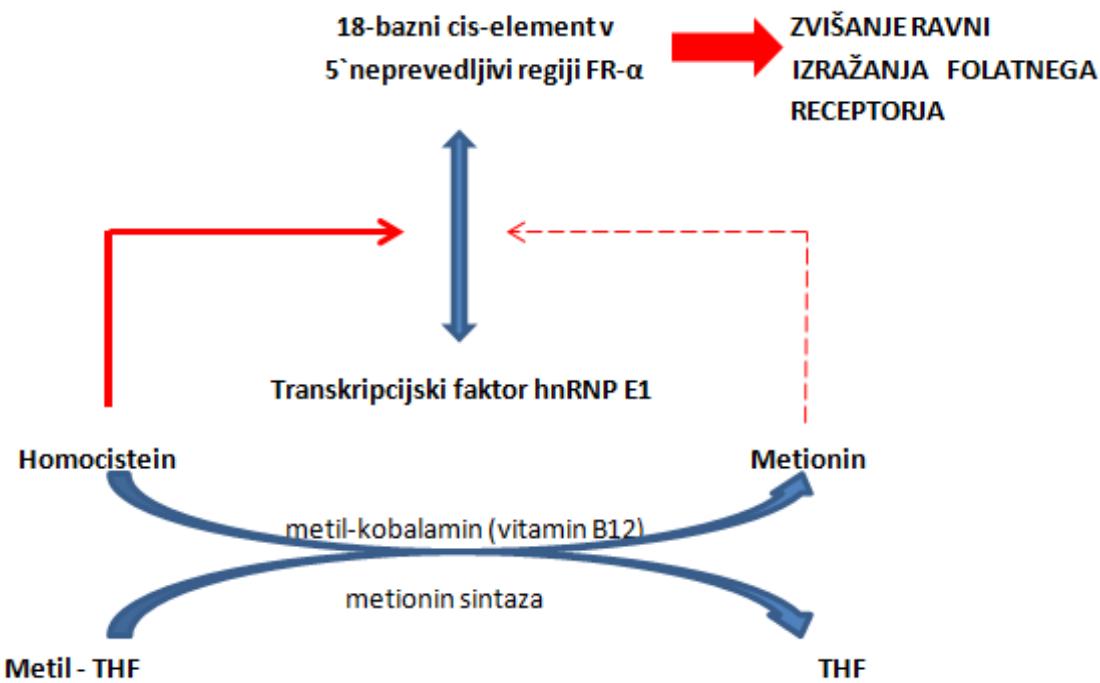
Čeprav so identificirali FR na številnih celicah, so ugotovili, da ti niso vedno sposobni vezave folatov. Kot smo že omenili je sposobnost vezave folatnih konjugatov na FR $\alpha$  v normalnih celicah omejena zaradi apikalne orientiranosti receptorja. FR $\beta$  pa se lahko nahaja v funkcionalni in v nefunkcionalni obliki, kar je povezano s še nerazjasnjenimi post-translacijskimi modifikacijami receptorja na teh celicah (61). FR $\beta$  izražen v zgodnji fazi razvoja mielomonocitne linije, v monocitih in zrelih nevtrofilih ni sposoben vezave folata (59, 61), v nasprotju z receptorjem izraženim v placenti, aktiviranih makrofagih, mieloični levkemiji in pri nekaterih drugih vrsta raka (48, 61, 62).

Iz dejstva, da so FR omejeno in specifično porazdeljeni po telesu ter, da se izražajo v rakavih celicah bi lahko sklepali, da njihovo izražanje pospešuje celično rast in posledično tudi rast tumorja, saj je folat izredno pomemben pri delitvi celic. Raziskave so ovrgle te domneve in pokazale, da obstaja inverzna povezava med izražanjem FR in celično proliferacijo. To so potrdili z študijami genske terapije na kultiviranih celicah ter v in vivo ter in vitro študijah na rakavih celicah materičnega vratu. Proliferacija je bila neodvisna od koncentracije folata v mediju oz. serumu (63). Nasprotno so po inkubaciji celic raka

jajčnikov s protitelesi za FR pokazali, da je manjšo izražanje FR privedlo do inhibicije celične rasti (64). Vse to kaže na zelo kompleksno povezavo med izražanjem FR in celično proliferacijo, kateri mehanizem bo ostal v domeni prihodnjih raziskovalcev.

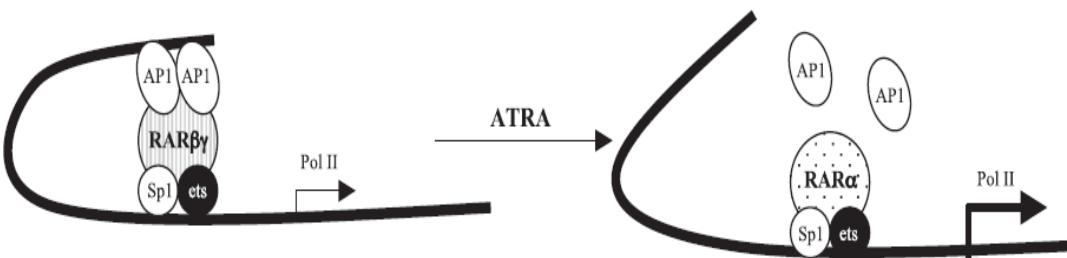
Kot vidimo, je izražanje FR izredno kompleksen proces, na katerega vpliva vrsto dejavnikov. Znano je, da se ob nizki koncentraciji folatov v serumu poveča izražanje FR, kar kaže na to, da se raven izražanja lahko poveča, kadar je potrebno izboljšanje preskrbe s folati. Pri inkubaciji celic raka materičnega vratu v mediju z nizko koncentracijo folata, se je izražanje FR povečalo za 9-krat medtem, ko se je količina FR mRNA povečala samo za 2-krat. To kaže na omejenost preučevanja FR proteinskega izražanja samo na študijah mRNA. Mehanizem povečanja izražanja FR ob nizki koncentraciji folatov je pojasnjen na nivoju FR $\alpha$  in ga prikazuje Slika 5. Homocistein je ključni modulator, ki povezuje koncentracijo folata v intracelularnem prostoru z izražanjem FR $\alpha$ . Izpraznitev zalog metil-THF povzroči inaktivacijo encima metionin sintaze, kar vodi v nabiranje homocisteina. Ta sproži interakcijo med citosolnim transkripcijskim faktorjem heterogenim nuklearnim ribonukleoproteinom E1 (hnRNP E1) in 18-baznim cis-elementom v 5'-neprevedljivi regiji *FOLR1* (gen, ki kodira za FR $\alpha$ ) in tako poviša raven izražanja folatnega receptorja. Po napolnitvi zalog metil-THF se encim metionin sintaza ponovno aktivira, zato se homocistein metilira v metionin. Ker je na voljo manj homocisteina se zniža raven izražanja folatnega receptorja na bazalno raven (65).

Kakšno bo povečanje izražanja FR $\alpha$ , glede na koncentracijo folata je torej odvisno od količine homocisteina, zato je le to odvisno od prevalence hiperhomocisteinemije v različnih populacijah. V zahodnem svetu ima več kot 60 % starejših ljudi ter več kot 75 % vege terijancev hiperhomocisteinemijo. To ima kliničen pomen, saj so ugotovili, da obstaja korelacija med hiperhomocisteinemijo in toksičnostjo na kemoterapijo, kjer uporabljamo antifolatno terapijo, saj se posledično zaradi večjega izražanja FR več antifolatov transportira v celico in deluje toksično (45, 66, 67).



**Slika 5:** Model povezave med intracelularno koncentracijo folata in ravnjo izražanja FR $\alpha$  (65). Razlaga pojmov: hnRNP E1 (heterogeni nuklearni ribonukleoproteinom E1), THF (tetrahidrofolat), FR (folatni receptor).

Moduliranje izražanja FR bi lahko uporabili tudi v namene boljšega ciljanja FR. Z uporabo transkripcijskih modulatorjev, bi lahko povisili raven izražanja genov za FR v tumorjih brez, da bi povzročili de novo sintezo receptorja v FR-negativnih tkivih. Tak transkripcijski modulator je ATRA (all trans retinoic acid), ki modulira izražanje *FOLR2* (gen, ki kodira za FR $\beta$ ) v KG-1 akutnih mieloičnih (AML) celicah (Slika 6). Zvišanje ravni izražanja FR $\beta$  z ATRA je hitro in reverzibilno. Bazalna transkripcija *FOLR2* je pogojena s transkripcijskim kompleksom, ki vključuje aktivirajoče Sp1/ets in inhibitorne Ap-1 proteine. ATRA inducira ekspresijo gena za FR $\beta$  samo v FR $\beta$ -pozitivnih celicah. V odsotnosti ATRA sta represorna RAR $\beta$  in RAR $\gamma$  (nuklearna receptorja; retinoic acid receptor RAR) povezana s promotorjem v kompleksu Sp1/ets/Ap-1. Pod temi pogoji je transkripcijska aktivnost RNK polimeraze II (Pol II) na bazальнem nivoju. V prisotnosti ATRA, se RAR $\alpha$  združi s Sp1/ets, zmanjša pa se povezava RAR $\beta$  in RAR $\gamma$  in represorskega Ap-1 proteina, kar vodi v povečanje transkripcijske aktivnosti Pol II. ATRA prav tako zmanjša količino inhibitornega Ap-1 transkripcijskega faktorja. Po terapiji z ATRA so uporabili folatne konjugate liposomov z doksorubicinom in dosegli višjo stopnjo ozdravitve (68).

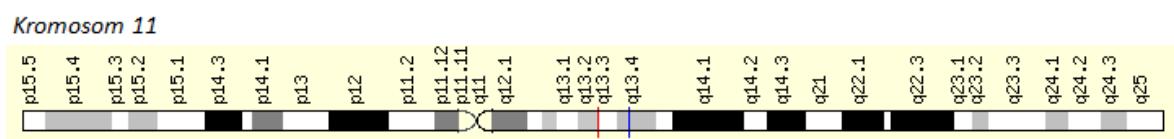


**Slika 6:** Mehanizem delovanja ATRA na izražanje FR $\beta$  (51).

Razlaga pojmov: ATRA (trans retinojska kislina; ang. all trans retinoic acid), AP-1 (aktivator protein 1; transkripcijski faktor), Sp1 (protein specifičnosti 1; transkripcijski faktor), ets (transkripcijski faktor), RAR (nuklearni receptor; ang. retinoic acid receptor), Pol II (RNK polimeraza II).

#### 1.3.2.3. Folatni receptor $\beta$ in njegova povezava s tumorskimi makrofagi

Folatni receptor  $\beta$  (alternativno poimenovan tudi kot folatni receptor 2) je protein, ki je kodiran z genom *FOLR2*. Gen se nahaja na kromosому 11 na lokusu q13 (69). Pozicijo *FOLR2* na kromosому 11 prikazuje Slika 7.



**Slika 7:** Pozicija gena *FOLR2* na kromosому 11 (69).

GM-CSF in M-CSF sta faktorja, ki modulirata diferenciacijo mieloidne celične vrste. GM-CSF prepreči izražanje *FOLR2* med in vitro monocit-makrofag diferenciacijo, tudi v prisotnosti M-CSF. Stopnjo izražanja *FOLR2* določa vsebnost GM-CSF in M-CSF v tkivu. Tudi drugi citokini v tumorskem tkivu vplivajo na izražanje gena za FR $\beta$ . Samostojno IL-6 in IL-10 v kombinaciji z M-CSF poveča izražanje FR $\beta$ . Tako lahko trdimo, da je M-CSF glavni faktor za izražanje receptorja FR $\beta$  na humanih makrofagih in sam ali v kombinaciji z ostalimi citokini (IL-10, IL-6) vpliva na izražanje FR $\beta$  na površini tumorskih makrofagov M2 (70).

Študija na monocitih, ki so jih in vitro aktivirali z M-CSF je pokazala, da je *FOLR2* preferenčno izražen gen v tumorskih makrofagih M2. FR $\beta$  se je izrazil v funkcionalni obliki (sposoben vezave folatnih konjugatov). Makrofagi M1 niso sposobni vezave folatov,

ker ne izražajo funkcionalnih FR. *FOLR1* in *FOLR3* (gena, ki kodirata za FR $\alpha$  in FR $\gamma$ ) se nista izražala v makrofagih M2, torej lahko sklepamo, da je FR $\beta$  odgovoren za privzem folatov v tumorske makrofage M2. Imunohistološka študija na rakavih celicah melanoma in adenokarcinoma dojk je pokazala, da so vsi FR $\beta$  makrofagi CD68+/CD163+, kar kaže na M2 fenotip FR $\beta$ -pozitivnih makrofagov. Obarvala se je samo stroma tumorja in ne same tumorske celice. Evaluacija izražanja FR $\beta$  na drugih tkivih je pokazala, da se FR $\beta$  nahaja tudi v stromi raka pljuč, želodca, dojk, debelega črevesja in jajčnikov (70).

To je v nasprotju z študijo na NSCLC, ki je ločeno proučevala makrofage M1 (CD68+/HLA-DR+) in M2 (CD68+/CD163+), kjer med obarvanostjo tumorskih celic in njihovo stromo niso ugotovili signifikantne razlike (26).

In vitro študija ekspresije *FOLR2* je dokazala, da se FR $\beta$  nahaja tudi na neaktiviranih makrofagih, pri čemer pa so ti FR $\beta$  nefunkcionalni. Stopnjo izražanja *FOLR2* regulirajo razni vnetni in protivnetni citokini. Tako se v prisotnosti citokinov IL-4, IL-13 in IL-10, ki promovirajo alternativno aktivacijo makrofagov, poveča izražanje *FOLR2* na makrofagih M2. Nasprotno se v prisotnosti LPS, ki promovirajo klasično aktivacijo makrofagov, izražanje *FOLR2* zmanjša, čeprav se količina FR $\beta$  na celični površini tumorskih makrofagov ne spremeni (zmanjša se količina intracelularnega FR $\beta$ ) (70). Ko se makrofagi aktivirajo, postanejo funkcionalni in tako sposobni vezave folatov (70, 71, 72).

#### 1.3.2.4. FR $\beta$ kot tarča protitumornih učinkovin in dostavnih sistemov

Funkcionalen FR $\beta$ , ki je sposoben privzema folatov in folatnih konjugatov v celice, je izražen na aktiviranih (in ne počivajočih) makrofagih, ki se nahajajo pri številnih vnetnih in avtoimunskeh boleznih (rak, revmatoidni artritis, ateroskleroza, lupus, Chronova bolezen, psoriaza...). Njihova selektivna supresija ali eliminacija bi lahko preko FR $\beta$  tarčnih zdravil predstavljala zdravljenje teh bolezni, brez škodovanja zdravim tkivom.

FR imajo v terapiji kot tarča rakavih in vnetnih obolenj številne prednosti:

- z visoko afiniteto vežejo majhno molekulo (folno kislino), ki jo lahko kemijsko konjugiramo z drugimi molekulami preko  $\gamma$ -karboksilne skupine, brez da bi zmanjšali njeni vezavni sposobnosti,
- imajo endocitozno aktivnost,
- so specifično porazdeljena po telesu.

V raziskavah se danes testira učinkovitost raznih proteinских toksinov, nanodelcev, liposomov, nizkomolekularnih kemoterapeutikov in drugih dostavnih sistemov, ki bi se lahko vezala na FR $\beta$  ali vplivala na izražanje *FOLR2*.

FR pa ne izkoriščamo samo za razvoj novih protitumornih učinkovin in dostavnih sistemov, ampak tudi za razvoj novih radiodiagnostikov, ki se po injiciraju nabirajo v različnih telesnih organih ali patoloških tkivih. S folatnimi radiodiagnostiki lahko ocenimo lokacijo in tudi aktivnost FR-pozitivnih rakov in vnetnih bolezni. Gre za neinvazivno diagnostično tehniko. Uporaba radioaktivnega izotopa tehnecija  $^{99m}\text{Tc}$  je preferenčna diagnostična tehnika pri ciljanju FR-pozitivnih tkiv. Ima kratko razpolovno dobo (6ur), zato lahko administriamo visoko dozo radionuklida, da dosežemo visoko resolucijo, s tem pa prekomerno ne izpostavljam zdravih tkiv. Odlikuje ga tudi lahka dostopnost in nizka cena (73).

## 2 NAMEN DELA

V okviru diplomskega dela želimo preučiti ali je izražanje gena *FOLR2* v NSCLC tkivu višje kot v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika. Želimo tudi ugotoviti ali je izražanje gena *FOLR2* morda povezano s kliničnimi podatki bolnikov: stadij bolezni, histološki tip tumorja, starost, spol, izguba telesne teže bolnikov, število let kajenja, 4-letno preživetje. Zanima pa nas tudi ali obstaja korelacija z drugimi geni, ki so bili izmerjeni v istih tkivih v preteklih raziskavah.

Glede na dostopno literaturo predvidevamo:

1. da je izražanje gena *FOLR2* višje v NSCLS tkivu kot v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika;
2. da je izražanje gena *FOLR2* 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 *FOLR2* v tumorskem in v sosednjem navidezno zdravem tkivu 40 bolnikov z NSCLC pljučnim rakom. Rezultate meritev bomo statistično ovrednotili in jih primerjali s kliničnimi podatki bolnikov ter tako poskušali dokazati še drugo hipotezo.

Čeprav izražanja *FOLR2* v NCSLC pljučnem rakavem tkivu ni izmeril še nihče, pričakujemo, da bomo hipotezi dokazali, saj vemo, da so tumorski makrofagi M2 poglavitne celice v tumorskem tkivu (dokazano tudi za NSCLC), za katere je dokazano, da so odgovorni za ekspresijo *FOLR2* v tumorskem tkivu. Glede na naravo kliničnih podatkov predvidevamo tudi, da obstaja povezava med kliničnimi podatki in izražanjem *FOLR2*, saj naj bi zvišano izražanje *FOLR2* pomenilo, da se v tumorskem tkivu nahaja več tumorskih makrofagov M2, ki promovirajo napredovanje bolezni in vodijo v agresivnejši histološki tip tumorja in nižje 4-letno preživetje.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 Vzorci**

Za merjenje izražanja gena *FOLR2* smo uporabili vzorce 40 bolnikov z NSCLC v stadiju I, II in III. Vključitveni kriterij je bil pljučni tumor brez metastaz, ki se ni vraščal v okolno tkivo. Vsakemu bolniku so odvzeli dva tkivna vzorca, in sicer prvega iz periferije tumorja (območje najhitrejše rasti) in drugega iz zdravega (netumorskega) pljučnega tkiva. Mesto odvzema slednjega je bilo od tumorja oddaljeno vsaj 10 cm, tkivo pa je bilo organoleptično neprizadeto. Tkvne vzorce so najkasneje v 15 minutah po resekciji pljuč potopili v tekoči dušik, kjer so jih hranili do nadaljnje analize. Vzorci cDNK so bili shranjeni na -80°C. Histološke analize tumorskih tkiv vzorcev so izvedli po histološki klasifikaciji WHO (74). Stadiji so bili določeni po TNM klasifikaciji (75). Študijo je odobrila nacionalna etična komisija, dovoljenje so dobili tudi od vseh udeležencev raziskave.

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 ocenjeni 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.

Pred našimi meritvami so iz vzorcev pljuč 40 bolnikov z NSCLC in iz vzorca, ki je služil kot interni standard, izolirali RNK.

Nato so z uporabo encima reverznatranskriptaza prepisali RNK v stabilnejšo cDNA, ki smo jo mi, kot matrico uporabili v reakciji PCR.

Vsem bolnikom smo z qPCR izmerili izražanje *FOLR2* v rakavem in v sosednjem navidezno zdravem tkivu (skupno 80 vzorcev).

#### **3.2 Materiali in aparature**

Droben laboratorijski material:

- pipete 2,5µl, 20µl, 200 µl, 1000µl,
- nastavki za pipete,
- Eppendorf mikropruvete: 0,2, 0,5, 1,5 in 2 ml,

- stojalo za mikropruvete,
- prozorna samolepilna folija,
- ploščica za PCR v realnem času s 96 vdolbinicami (Applied Biosystems),
- pinceta.

Aparature:

- avtoklav,
- brezprašna PCR komora,
- vrtinčnik (BIOSAN),
- centrifugurka (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

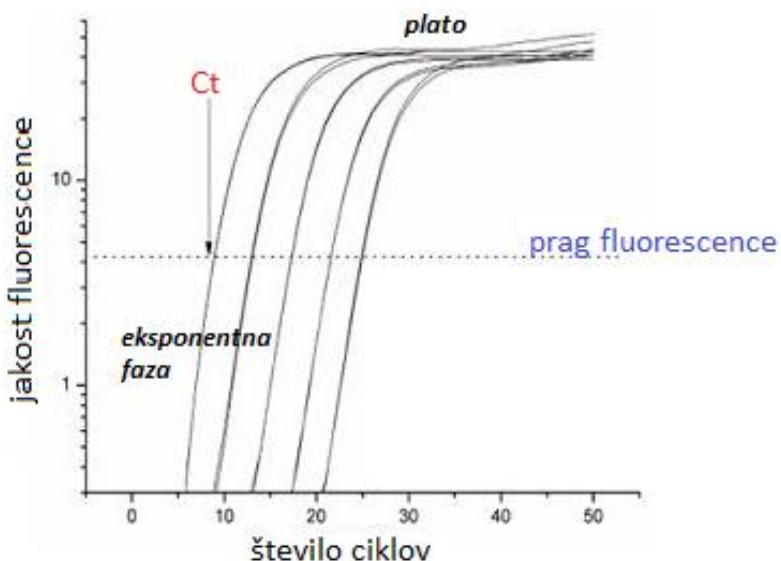
Verižna reakcija s polimerazo je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij želenega odseka DNK. Zaradi tega za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca, kar pomeni bistveno prednost PCR pred klasičnimi tehnikami molekularne biologije (76).

Pri konvencionalnem PCR poteka detekcija produktov po končanem pomnoževanju, in sicer navadno z elektroforezno ločbo produktov na agaroznem gelu. To je lahko že končni rezultat analize, kadar nas zanima ali je v vzorcu prisoten določen odsek DNK ali RNK (dokazovanje okužb z virusi) (77). Največkrat nam produkti PCR služijo kot izhodni material za nadaljne analize, s katerimi ugotavljamo prisotnost sprememb v nukleotidnem zaporedju posameznikove lastne DNK (zamenjave, delecije, insercije nukleotidov), ki so lahko vzrok določenih obolenj (78). Pogosto pa nas zanima tudi, kakšna je koncentracija določene DNK ali RNK v preiskovanem vzorcu. Teoretično se število kopij želenega odseka v vsakem ciklu podvoji, ampak v resnici se v poznejših ciklih reakcija postopno upočasnuje zaradi porabe sestavin reakcijske zmesi, manjše aktivnosti DNK polimeraze in kopičenja inhibitornih produktov. Število kopij se ne podvoji več v vsakem ciklu, ampak

narašča počasneje, dokler ne doseže platoja, ko se reakcija ustavi (79, 80). Samo v eksponentni fazi lahko iz količine produkta PCR zanesljivo sklepamo na začetno število kopij matrice v vzorcu. To dejstvo predstavlja pomembno omejitev konvencionalnega PCR, kjer poteka detekcija po končanem pomnoževanju.

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času predstavlja nadgradnjo konvencionalnega PCR. Sinonim zanj je kinetični 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 fluorescenčni prag, ki predstavlja tisto intenziteto fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Nato, kot kaže Slika 8, za vsak vzorec določimo cikel, pri katerem izmerjena fluorescenza preseže ta prag ( $C_t$ ).

Pri tej metodi smo torej v nasprotju z običajnim PCR dodali še fluorescenčno sondu Hs00265255\_m1, specifično za gen *FOLR2*. Ta je bila ob vsaki pomnožitvi tarčnega segmenta razgrajena in je tako oddala fluorescentni signal, ki ga je zaznal aparat za qPCR. Pri večjem začetnem številu kopij matrice signal prej preseže linijo fluorescenčnega praga in zato določimo nižji  $C_t$ . Vrednosti  $C_t$  so obratno sorazmerne z začetnim številom kopij matrice in jih lahko uporabimo za izračun absolutne (dejansko število kopij cDNK v vzorcu – absolutna kvantifikacija) ali relativne količine (razliko v izražanju gena med dvema vzorcema – relativna kvantifikacija) cDNK določenega pomnožka (80).



**Slika 8:** Prikaz krivulje jakosti fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri PCR v realnem času (81).

### 3.3.2 Načini detekcije

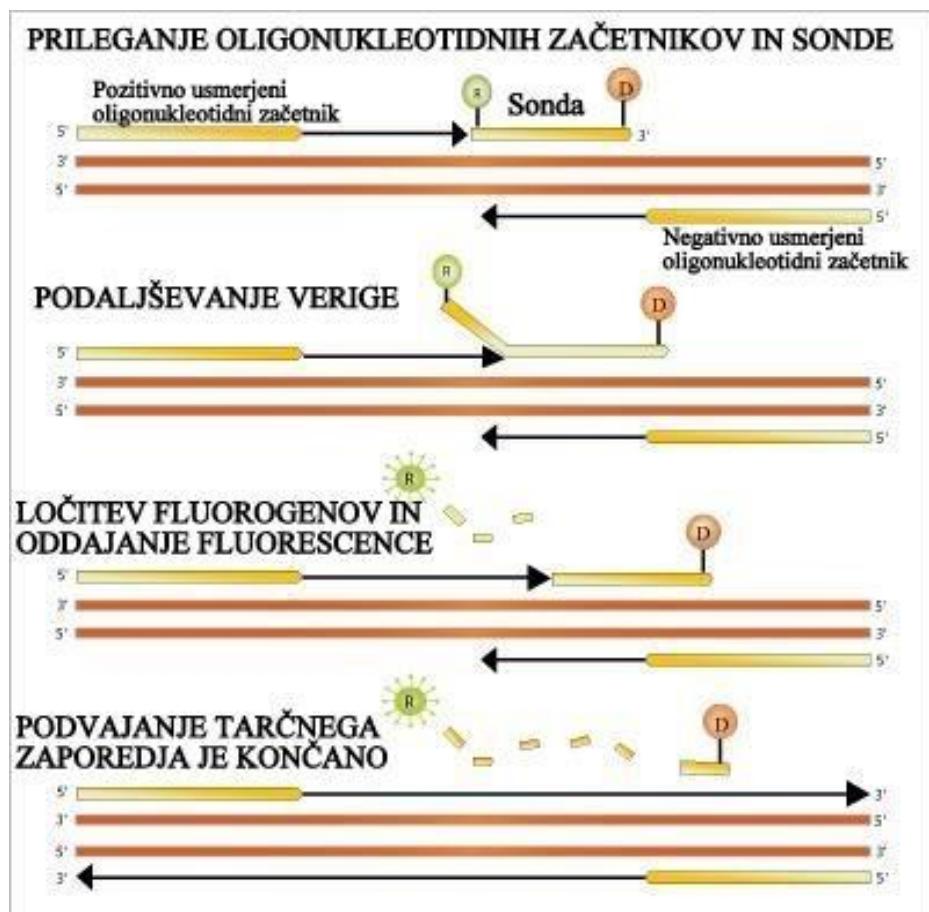
Obstaja več načinov za detekcijo produktov pomnoženih s qPCR. Razdelimo jih lahko v dve skupini glede na to ali z njimi zaznamo samo specifični produkt ali pa zaznamo tudi morebitno prisotne nespecifične produkte.

Med **nespecifične načine detekcije** spadajo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v nastajajočo dvojerižno DNK, 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 dvojerižno DNK pa ob ekscitaciji močno fluorescira. Količina fluorescence je tako sorazmerna s količino nastale dvojerižne DNK. S to metodo ne zaznamo samo specifičnih produktov, ampak vso dvojerižno DNK, ki je prisotna v zmesi, zato je za njenou uporabo potrebna natančna optimizacija (82).

Pri **specifičnih načinih detekcije** uporabljamo s fluorofori označene oligonukleotide. Ti se specifično vežejo na odsek DNK, ki ga pomnožujemo. Za meritev signala izkoriščamo princip FRET tehnologije (Förster 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, vzbujenje donorskoga barvila povzroči sevanje svetlobe. Ta

vzbudi akceptorsko barvilo, ki posledično seva svetlobo drugačne valovne dolžine (83). Kot sonde se najpogosteje uporabljajo hidrolizirajoče in hibridizacijske sonde ter molekularna svetila.

TaqMan analiza (Applied Biosystems) temelji na hidrolizirajočih sondah, kjer izkoriščamo 5'-eksonukleazno aktivnost DNK-polimeraz. Najpogosteje se uporablja *Taq* DNK-polimeraza. V reakcijsko zmes dodamo sondu, ki se specifično veže na tarčno zaporedje na DNK. 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 receptorsko barvilo (dušilec), ki to fluorescenco prestreže. 5'-eksonukleazna aktivnost *Taq*DNK-polimeraze povzroči v stopnji podaljševanja hidrolizo sonda. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se poveča in onemogoči prestrezanje fluorescence. Fluorescensa reporterskega barvila zato poraste in je sorazmerna s količino produkta PCR (Slika 9) (83, 84).



Slika 9: Princip delovanja PCR v realnem času s sondijo TaqMan (84).

### 3.3.3 Potek reakcije PCR v realnem času

V PCR brezprašni komori smo si najprej pripravili MasterMix pufer (MM pufer), ki so ga sestavljali:

**Preglednica III:** Sestavine in njihovi volumni za MM pufer.

Sestavine	Volumen (za en nanos)
Fast Start Universal Probe Master (ROX), Roche; ref: 04913949001	12,5 µL
TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) – sonda Hs00265255_m1	0,75 µL
Ultra čista voda (dH <sub>2</sub> O)	10,75 µL

Poleg MM pufra smo rabili še:

**Preglednica IV:** Sestavine in njihovi volumni, ki so poleg MM pufra še potrebni pri PCR v realnem času.

Sestavine	Volumen (za en nanos)
Ultra čista voda (dH <sub>2</sub> O)	1 µL
cDNK vzorec tumorskih in kontrolnih tkiv bolnikov	1 µL
cDNK vzorec internega standarda (IS)	1 µL

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

Nato smo pripravili ploščico za PCR v realnem času s 96 vdolbinicami (Applied Biosystems). V vsako vdolbinico smo nanašali po 1 µl reagentov. Negativno kontrolo (dH<sub>2</sub>O) v dvojniku, cDNK vzorce tumorjev in kontrolnega tkiva ter interni standard pa v

trojniku. Nato smo v vsako vdolbinico z reagentom dodali še 24 µl MM pufra in tako je skupen volumen posamezne vdolbinice znašal 25 µl.

Z dodajanjem negativne kontrole se prepričamo, da reagenti niso kontaminirani s tarčno nukleinsko kislino. Interni standard pa je cDNK pljučnega tkiva naključno izbranega bolnika, ki se analizira v vsaki seriji meritev. Omogoča nam postavitev praga občutljivosti v različnih serijah na isti nivo. S tem zmanjšamo medserijsko neponovljivost, ki je posledica različnega delovanja analizatorja zaradi zunanjih vplivov pa tudi zaradi različne umeritve detektorja fluorescenčne svetlobe med posameznimi serijami meritev.

Plošče smo prelepili s samolepljivo prosojno folijo, zvrtinčili, nato pa še centrifugirali 2 minuti. V primeru, da so bili po 2-minutah prisotni mehurčki, smo dali še enkrat v centrifugirko. cDNK smo pomnoževali v cikličnem termostatu za PCR v realnem času (ABI PRISM SDS 7000) po naslednjem programu:

- začetna denaturacija vzorca:
  - 50°C; 2 min; 1 cikel
  - 95°C; 10 min; 1 cikel
- pomnoževanje:
  - 95°C; 15 s; denaturacija; 40 ciklov
  - 60°C; 1 min; prileganje začetnih oligonukleotidov, pomnoževanje

Za zmanjšanje števila lažno pozitivnih rezultatov je potek dela natančno določen, kar vključuje fizično ločene prostore priprave reakcijskih mešanic in ločen laboratorijski material (pipete, nastavki, rokavice...).

### 3.3.4 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 *FOLR2* smo normalizirali na izražanje hišnega gena *GUS* (gen za β-glukuronidazo). 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 cDNK 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. Poiskali smo tistega, ki se je najbolje izražal v vseh tkivih vseh bolnikov in je bil neodvisen od bolezni oz. tumorja. Hišni gen se namreč izraža vedno enako, ne glede na bolezen. Razlike med vzorci pa so posledica razlik med izolacijo mRNA tkiva, uspešnosti izolacije, variabilnosti tkiva za izolacijo ipd.

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 vzorcev z vrednostmi Ct v kontrolnem vzorcu. Povprečno PCR amplifikacijsko učinkovitost za *FOLR2* in *GUS* smo dobili z izračunom relativne količine mRNA *FOLR2* z uporabo enačbe:

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

RQ.....relativna količina mRNA *FOLR2*

E.....učinkovitost amplifikacije

Ct....pražni cikel

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ gena } FOLR2 - \Delta Ct \text{ gena } GUS$$

### 3.4 Zanesljivost postopka in priporočila

Reagente za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času TaqMan®Gene Expression Assay in Fast Start 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 mikropruveti 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 odmrzjeni na sobni temperaturi. Ko smo jih odvzeli potrebno količino, smo ostanek znova zamrznili. Z večkratnim odmrzovanjem in zamrzovanjem bi lahko povzročili spremembo v stabilnosti cDNA. 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 Wilcoxonovim testom. Kruskal-Wallisev ali Fisherjev test smo uporabili za primerjave enakih parametrov med skupinami. Povezave med variabilnostmi smo ocenili s Spearmanovim redom. 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 V.

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

Parameter	Podatki
število	39
spol (ženske/moški)	11/28
starost (leta)	61,0 {53,0/67,0} (44–76)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,5 {22,1/28,3} (16,4–46,5)
izguba teže v zadnjih treh mesecih (ne/da)	23/16
kadilec (nikoli/trenutni ali bivši)	4/35
stadij bolezni (I–III)*	15/13/11
histološki tip tumorja (ploščatocelični/žlezni/velikocelični/drugi)	19/11/5/4

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 (75)

Med 4-letnim spremeljanjem bolnikov je 1 bolnik umrl zaradi nerakavega vzroka, zato smo ga izključili iz statistične analize. 21 bolnikov je umrlo zaradi napredovanja bolezni, 18 pa jih je bilo po 4 letih še živih. V raziskavi so sodelovali pretežno moški. Teh je bilo 28, žensk pa samo 11. Povprečna starost bolnikov je bila 61 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...). Indeks telesne mase je pri udeležencih študije v povprečju

znašal kar 25,5, kar je nad mejo, ki označuje prekomerno telesno težo. 16 bolnikov je v zadnjih treh mesecih izgubilo od 1 do 8 kilogramov telesne teže, kar je lahko posledica napredovanja bolezni.

Od vseh bolnikov le širje niso nikoli kadili medtem, ko jih je kadilo 35, nekateri tudi med samo študijo. 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 77 % udeležencev. Glede na histološki tip tumorja so prevladovali tisti s ploščatoceličnim, sledil je žlezni, za njim velikocelični, nekaj bolnikov pa je imelo ostale histološke tipe raka.

## 4.2 Rezultati meritev izražanja gena *FOLR2*

Potrditev naših hipotez bi pomenilo, da bi bilo smiselno razvijanje novih učinkovin in dostavnih sistemov, ki ciljajo FR $\beta$  in s tem tudi tumorske makrofage M2. Tako bi supresija ali eliminacija tumorskih makrofagov, ki imajo pro-tumorsko delovanje, predstavljal pot ozdravitve pacientov, ki so zboleli za rakom. Prekinili pa bi tudi dostavo folatov v rakave celice, kar bi onemogočilo sintezo DNK, njeno popravljanje, hitro delitev celic in v končni fazi preprečilo nadaljni razvoj tumorja in povzročilo propad rakavih celic.

Rezultati meritev iz katerih smo delali statistično analizo so predstavljeni v Preglednici VI.

**Preglednica VI:** Rezultati meritev Ct tarčnega gena *FOLR2*, hišnega gena *GUS*, normalizacija *FOLR2*, relativno izražanje *FOLR2* ter razmerje *FOLR2* v kontrolnem in tumorskem tkivu.

vzorec	<i>FOLR2</i>		<i>GUS</i>		Normalizacija <i>FOLR2</i>		<i>FOLR2</i> K	<i>FOLR2</i> T	<i>FOLR2</i> K/T
	K	T	K	T	K	T	T/K	$2^{-\Delta Ct}$	$2^{-\Delta Ct}$
1	28,06	23,72	27,52	26,46	0,54	-2,74	-3,29	0,69	6,70
2	23,63	23,53	26,94	26,07	-3,31	-2,54	0,77	9,94	5,83
3	24,30	24,04	25,69	23,94	-1,39	0,10	1,49	2,61	0,93
6	25,04	24,50	25,46	26,03	-0,42	-1,53	-1,11	1,34	2,88
8	25,24	24,96	25,59	25,62	-0,35	-0,66	-0,31	1,27	1,58
									0,81

vzorec	<i>FOLR2</i>		<i>GUS</i>		Normalizacija <i>FOLR2</i>		<i>FOLR2</i> K	<i>FOLR2</i> T	<i>FOLR2</i>
	K	T	K	T	K	T	T/K	$2^{-\Delta Ct}$	K/T
9	24,68	24,64	25,76	25,45	-1,08	-0,81	0,26	2,11	1,76
10	25,70	23,56	25,95	25,13	-0,25	-1,57	-1,32	1,19	2,97
11	24,62	23,29	26,40	25,72	-1,78	-2,43	-0,64	3,44	5,38
12	24,13	23,70	25,82	26,47	-1,69	-2,77	-1,08	3,22	6,82
13	24,21	24,19	26,38	26,17	-2,17	-1,98	0,19	4,50	3,94
14	25,28	24,91	25,85	26,57	-0,57	-1,66	-1,08	1,49	3,15
16	24,08	25,78	25,56	26,29	-1,48	-0,51	0,97	2,78	1,42
17	24,69	24,37	26,54	26,88	-1,85	-2,51	-0,66	3,61	5,70
18	24,96	22,15	25,77	25,20	-0,81	-3,05	-2,24	1,76	8,28
19	23,87	24,62	25,03	25,10	-1,16	-0,48	0,68	2,23	1,39
20	24,67	25,13	25,39	26,06	-0,72	-0,93	-0,21	1,64	1,90
22	24,54	23,30	26,42	26,64	-1,88	-3,34	-1,46	3,67	10,10
23	27,47	24,73	25,79	25,07	1,68	-0,34	-2,02	0,31	1,27
25	24,46	23,75	27,31	26,29	-2,85	-2,54	0,31	7,21	5,80
26	25,40	29,08	26,21	26,15	-0,81	2,94	3,74	1,75	0,13
27	25,60	24,12	26,54	25,91	-0,93	-1,79	-0,85	1,91	3,45
28	25,02	26,25	25,97	27,46	-0,95	-1,21	-0,26	1,94	2,32
29	24,73	24,81	25,44	25,35	-0,71	-0,54	0,17	1,63	1,45
31	25,10	25,04	25,17	26,03	-0,07	-0,99	-0,92	1,05	1,99
32	28,21	26,88	25,04	26,40	3,17	0,48	-2,69	0,11	0,72
33	27,49	25,22	25,67	26,48	1,82	-1,26	-3,08	0,28	2,39
34	23,91	23,41	26,04	26,41	-2,13	-3,00	-0,87	4,39	8,02
35	25,62	24,15	26,38	25,41	-0,76	-1,26	-0,50	1,69	2,39
37	26,46	23,25	24,85	25,04	1,61	-1,79	-3,40	0,33	3,46
38	24,41	24,81	24,97	25,35	-0,56	-0,54	0,01	1,47	1,46
39	23,55	24,56	25,93	26,72	-2,38	-2,16	0,22	5,21	4,46
40	24,79	28,06	25,72	26,72	-0,93	1,34	2,27	1,90	0,39
41	24,79	27,68	25,23	26,77	-0,44	0,91	1,36	1,36	0,53
42	23,93	25,89	26,48	26,17	-2,55	-0,28	2,27	5,84	1,21
43	26,87	23,29	24,35	25,74	2,52	-2,45	-4,97	0,17	5,46
44	26,16	24,24	24,40	25,22	1,76	-0,98	-2,75	0,29	1,98
									0,15

vzorec	<i>FOLR2</i>		<i>GUS</i>		Normalizacija <i>FOLR2</i>		<i>FOLR2</i> K	<i>FOLR2</i> T	<i>FOLR2</i>
	K	T	K	T	K	T	T/K	$2^{-\Delta Ct}$	K/T
45	24,07	25,38	26,53	25,39	-2,46	-0,01	2,45	5,50	1,01
46	24,74	25,09	26,14	25,72	-1,40	-0,63	0,78	2,65	1,54
47	25,61	25,73	25,88	24,91	-0,27	0,82	1,09	1,21	0,57
Povp	25,13	24,76	25,85	25,91	-0,72	-1,15	-0,43	2,45	3,15
SD	1,18	1,40	0,70	0,70	1,48	1,35	1,80	2,09	2,49
									2,53

Razlaga pojmov: *FOLR2* (gen za folatni receptor  $\beta$ ), *GUS* (hišni gen za  $\beta$ -glukuronidazo), K (kontrolno tkivo), T (tumorsko tkivo).

*GUS* je bil izmerjen v tkivih istih pacientov v predhodnih raziskavah.

#### 4.2.1 Izražanje gena *FOLR2* v tumorskem in kontrolnem tkivu

Izmerili smo, da je izražanje gena *FOLR2* v tumorskem tkivu za 32 % večje kot v kontrolnem tkivu, vendar razlika ni bila statistično signifikantna. Ta rezultat smo dobili iz razmerja median tumorskega (mediana = 2,32) in kontrolnega (mediana = 1,76) tkiva;  $p = 0,1181$ .

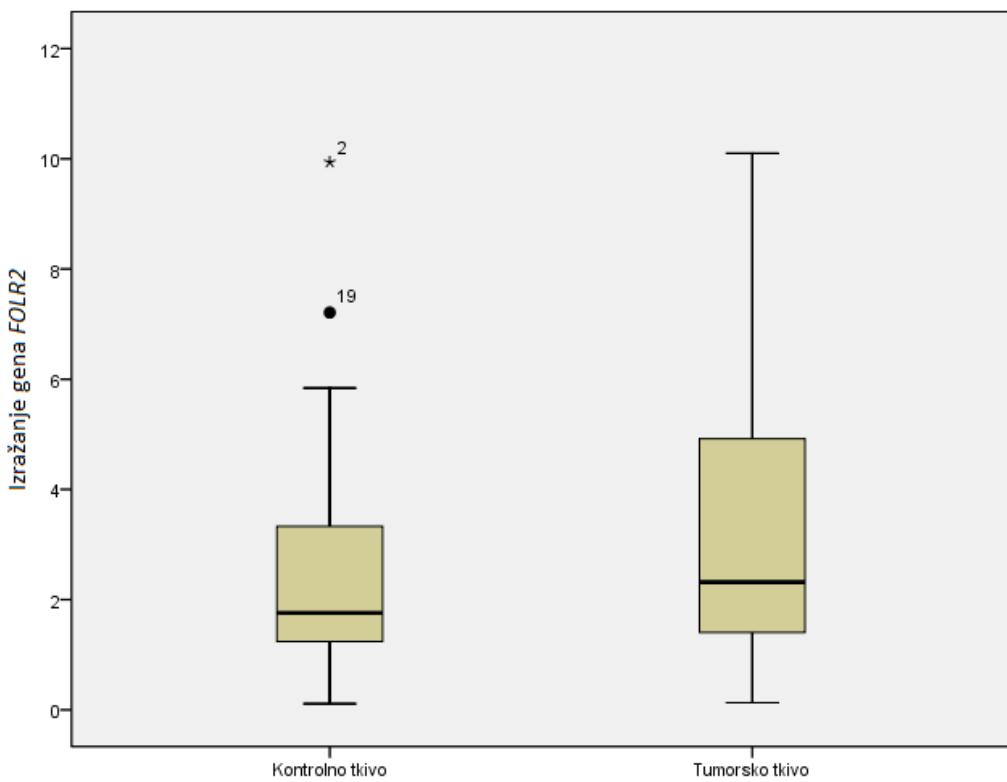
Izražanje gena je bilo povišano v tumorskem tkivu 25 bolnikov, kar znaša 74,4 % preiskovancev. Rezultati so predstavljeni v Preglednici VII in na Sliki 10. Z rezultati smo prišli do zaključka, da prve hipoteze ne moremo sprejeti, saj izražanje gena *FOLR2* v NSCLC ni statistično signifikantno višje kot v sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika.

**Preglednica VII:** Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena *FOLR2* v tkivu.

Parameter	Rezultati
Izražanje gena v tumorskem tkivu	2,32 {1,39/5,38} (0,13 – 10,10)
Izražanje gena v kontrolnem tkivu	1,76 {1,21/3,44} (0,11 – 9,94)

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

Izražanje gena *FOLR2* je standardizirano glede na izražanje hišnega gena *GUS*



**Slika 10:** Statistična analiza izražanja *FOLR2* v tumorskem in kontrolnem tkivu.

Slika prikazuje največjo in najmanjšo vrednost, kvartile ter mediano za posamezno skupino vzorcev. Pri kontrolnem tkivu je prikazan tudi osamelec (·), ki je zunaj intervala  $Q_3 + 1,5Q$  ter en ekstremni osamelec (\*), ki je izven intervala  $Q_3 + 3Q$ .

Iskanje vzrokov za naše rezultate nas je privedlo do različnih možnih razlag.

Dokazano je, da je v NSCLC tkivu več kot 70 % makrofagov tipa M2 (26) ter, da so prav ti odgovorni za izražanje FR $\beta$  (70). Kot že povedano, so ugotovili, da je *FOLR2* preferenčno izražen gen v makrofagih M2, kjer se receptor izrazi v funkcionalni obliki. Makrofagi M1 niso izražali funkcionalnih folatnih receptorjev, ter *FOLR1* in *FOLR3* se nista izražala v makrofagih M2. Torej samo FR $\beta$  se izraža na makrofagih M2 in to v funkcionalni obliki. Tako si lahko razlagamo, da se FR $\beta$  v tumorskem tkivu nahaja v funkcionalni obliki (sposoben vezave folatov), v kontrolnem tkivu pa v nefunkcionalni obliki (nesposoben vezave folatov), saj vemo, da se FR $\beta$  zaradi različnih post-translacijskih modifikacij lahko nahaja v obeh oblikah. Tako je tumorsko tkivo preskrbljeno z zadostno količino folatov, ki so potrebni za intenzivno celično delitev in razvoj tumorja. To bi lahko preverili z študijo prizema specifičnih radioligandov v celice, ki se vežejo samo na FR $\beta$ . Zakaj pa bi se *FOLR2* sploh izražal v kontrolnem tkivu? Verjetno so vzrok makrofagi tipa M1, ki kot vemo prav tako izražajo *FOLR2*, vendar receptor ni funkcionalen.

Kot vidimo smo pri analizah, ki merijo samo količino mRNK FOLR2, zelo omejeni. Ti podatki nam ne dajo nobenih informacij o funkcionalnosti receptorja in tudi ne o njegovem nahajanju na oz. v celici. Druga razлага za naše rezultate bi lahko bila, da se v tumorskih vzorcih FR $\beta$  nahaja na sami površini celice, v kontrolnem tkivu pa je več receptorja intracelularno, zato je tudi manjši privzem folatov v zdravo tkivo, v tumorsko tkivo pa je povečan.

Tretjič bi lahko rekli, da v našem preučevanem tkivu ni veliko tumorskih makrofagov M2, ki bi povečali izražanje *FOLR2*. Vzrok je najverjetneje v izbiri samih pacientov, saj se 77 % udeležencev raziskave nahaja v začetnih stadijih tumorja (I in II). Za bolj zanesljive rezultate bi rabili večji vzorec, ter tudi večje število udeležencev z napredovalimi oblikami pljučnega raka (stadij III in IV).

Nazadnje bi lahko rekli, da FR $\beta$  sintetizira tudi kaka druga celica in ne samo tumorski makrofag, verjetno sama tumorska celica ali celice strome, zato v tumorskem tkivu ne dobimo večjega izražanja glede na kontrolno tkivo.

#### 4.2.2 Korelacija med izražanjem gena *FOLR2* 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 *FOLR2* v tumorskem tkivu ne korelira z izražanjem gena *FOLR2* v kontrolnem tkivu ( $r = 0,2409$ ;  $p = 0,1396$ ). To pomeni, da so mehanizmi izražanja gena v tumorskem in kontrolnem tkivu različni ali pa, da so populacije celic, ki izražajo receptor, različne.

#### 4.2.3 Izražanje gena *FOLR2* v različnih stadijih bolezni

Iz Preglednice VIII in Slike 11 bi lahko sklepali, da višji kot je stadij bolezni, višje je izražanje *FOLR2*, vendar so rezultati pridobljeni s Spearmanovim testom korelacije pokazali, da izražanje gena *FOLR2* v tumorskem tkivu ne korelira s stadijem bolezni;  $p = 0,1358$  (stadiji od I do III). S tem smo ovrgli naša predvidevanja, da je z višjim stadijem bolezni, višje tudi izražanje gena *FOLR2* v tumorskem tkivu, saj smo predvidevali, da je v napredovalih oblikah raka več tumorskih makrofagov M2, ki povečujejo izražanje tega gena ter več hitro rastočih tumorskih celic. Vendar se je izkazalo, da ne glede na to, v

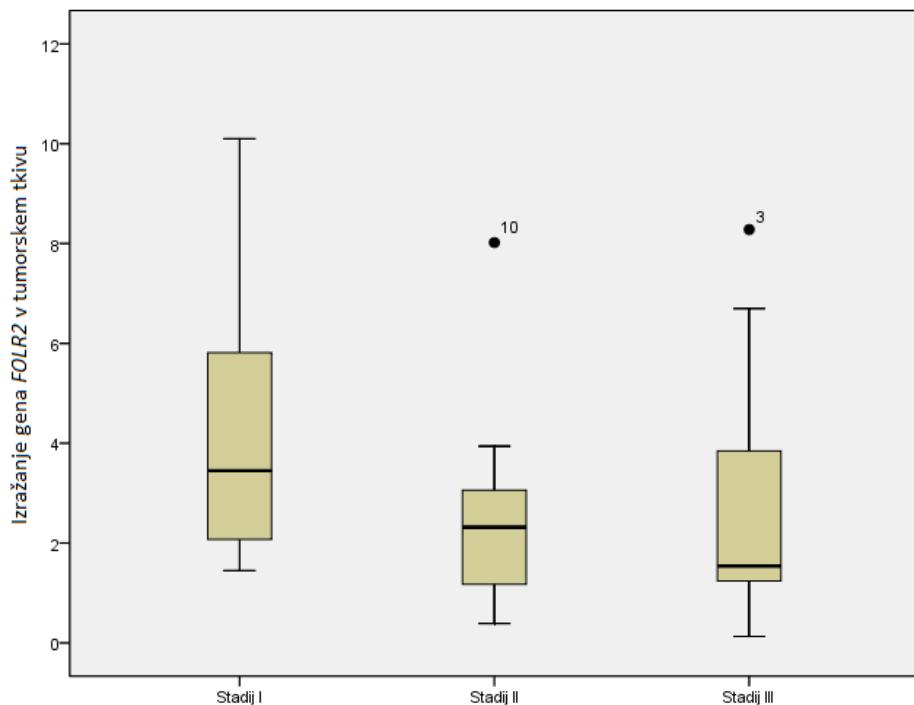
katerem stadiju so bili bolniki, se izražanje gena *FOLR2* v tumorskem tkivu ni bistveno razlikovalo. Možno je, da so receptorji v poznejših stadijih funkcionalni, v zgodnjih pa nefunkcionalni, vendar bi za potrditev potrebovali tudi dodatne študije funkcionalnosti receptorja.

**Preglednica VIII:** Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena *FOLR2* v tumorskem tkivu glede na stadij bolezni.

Parameter	Rezultati
Izražanje gena v tumorskem tkivu pri 1. stadiju	3,45 {1,58/5,80} (0,53 – 10,10)
Izražanje gena v tumorskem tkivu pri 2. stadiju	2,32 {0,83/3,55} (0,39 – 8,02)
Izražanje gena v tumorskem tkivu pri 3. stadiju	1,54 {1,21/5,70} (0,13 – 8,28)

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

Izražanje gena *FOLR2* je standardizirano glede na izražanje hišnega gena *GUS*



**Slika 11:** Statistična analiza izražanja *FOLR2* v različnih stadijih tumorskega tkiva.

Slika prikazuje največjo in najmanjšo vrednost, kvartile in mediano za posamezno skupino vzorcev ter dva osamelca (•) pri stadiju II ter stadiju III, ki sta zunaj intervala  $Q_3 + 1,5Q$ .

#### 4.2.4 Izražanje gena *FOLR2* 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. Pričakovali smo, da bo izražanje gena večje v žleznem histološkem tipu, za katerega je znano, da je agresivnejši in povezan s krajšim preživetjem bolnika, prav tako pa viri trdijo, da je FR $\beta$  prisoten predvsem na tumorjih ne-epitelijskega izvora (57, 58). Ploščatocelični NSCLC izhaja iz epitelijskih celic, žlezni pa iz žleznih, torej ne-epitelijskih celic. Vendar pa so rezultati z mejno statistično signifikantnostjo pokazali ravno obratno, saj je bilo izražanje *FOLR2* v tumorskem tkivu ploščatoceličnega karcinoma za 2,17-krat višje, kot v žleznem karcinomu. Ta rezultat smo dobili iz razmerja median ploščatoceličnega karcinoma (mediana = 3,15) in žleznega karcinoma (mediana = 1,45);  $p = 0,0555$  in ga prikazuje Preglednica IX.

**Preglednica IX:** Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena *FOLR2* v tumorskem tkivu glede na histološki tip.

Parameter	Rezultati
Izražanje gena v ploščatoceličnem tumorju	3,15 {1,42/5,80} (0,39 – 8,28)
Izražanje gena v žleznem tumorju	1,45 {0,93/3,45} (0,13 – 5,70)

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

Izražanje gena *FOLR2* je standardizirano glede na izražanje hišnega gena *GUS*

Tudi druga študija izražanja FR v različnih tumorskih in normalnih tkivih dokazuje nasprotno (85). Ugotovili so, da je v bolj agresivnih tipih tumorja, vključno z metastatskimi, izražanje FR višje. Kar je logično, saj predvidevamo, da rakava celica za svojo hitro rast potrebuje več hranil. Študija je bila izvedena tudi v vzorcih tumorja pljuč, ampak ni specifično definirala vrste FR. Merili so privzem folne kisline označene z radioaktivnim izotopom vodika, ki se veže na vse folatne receptorje, s tem pa so ugotavljali funkcionalnost receptorja. Tudi v našem primeru je možno, da so receptorji v žleznem (bolj agresivnem tipu tumorja) bolj funkcionalni in zato so sposobni privzema večje količine folatov, čeprav je izražanje gena manjše.

#### 4.2.5 Izražanje gena *FOLR2* in izguba telesne teže

Z dobljenimi rezultati smo naredili primerjavo med izražanjem gena *FOLR2* v tumorskem tkivu bolnikov, ki niso izgubili teže in v tumorskem tkivu bolnikov, ki so izgubili od 1 do 8 kg telesne teže. Izguba telesne teže je lahko posledica napredovanja bolezni. Telesno težo je izgubilo 16 bolnikov, 23 bolnikov pa je ostalo na isti telesni teži.

Rezultate prikazuje Preglednica X. Iz nje lahko razberemo, da je izražanje gena *FOLR2* nekoliko večje v tumorskem tkivu pri bolnikih, ki so izgubili telesno težo.

**Preglednica X:** Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena *FOLR2* v tumorskem tkivu glede na izgubo telesne teže.

Parameter	Rezultati
Izražanje gena v tumorskem tkivu brez izgube telesne teže	1,99 {1,45/3,94} (0,57 – 8,28)
Izražanje gena v tumorskem tkivu z izgubo telesne teže	2,65 {0,95/5,72} (0,13 – 10,10)

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

Izražanje gena *FOLR2* je standardizirano glede na izražanje hišnega gena *GUS*

#### 4.2.6 Izražanje gena *FOLR2* 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 bolniki, ki kadijo ali so kadili včasih, 31 % večje izražanje gena *FOLR2* (Preglednica XI). Vendar pa razlika ni statistično signifikantna. Vseeno moramo na tem mestu našo analizo omejiti, saj je imamo v vzorcu zelo malo nekadilcev (10 %).

**Preglednica XI:** Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena *FOLR2* v tumorskem tkivu glede na kajenje.

Parameter	Rezultati
Izražanje gena v tumorskem tkivu kadilcev	2,39 {1,39/5,38} (0,13 – 10,01)
Izražanje gena v tumorskem tkivu nekadilcev	1,56 {1,08/4,75} (0,93 – 5,80)

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

Izražanje gena *FOLR2* je standardizirano glede na izražanje hišnega gena *GUS*

#### 4.2.7 Izražanje gena *FOLR2* in preživetje

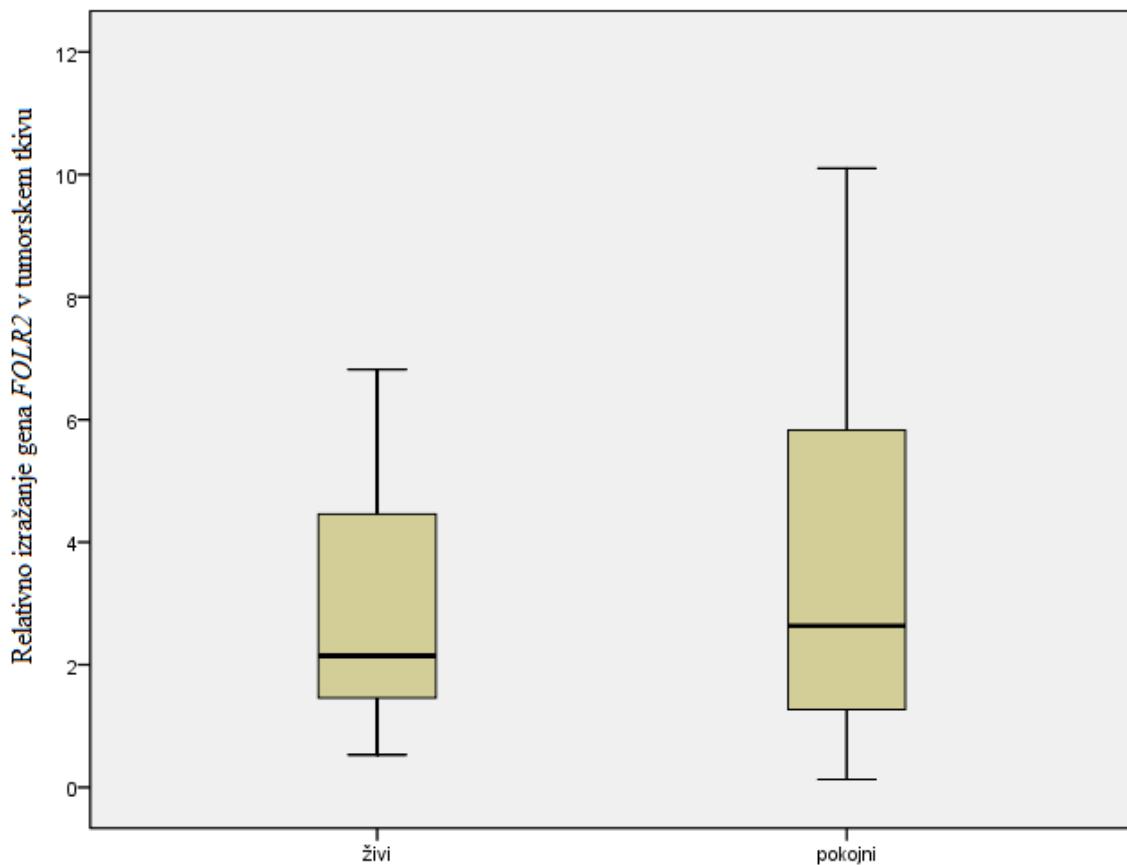
V izražanju gena *FOLR2* v tumorskem tkivu med preživelimi in preminulimi bolniki po 4 letih po operaciji ni razlike (Preglednica XII, Slika 12). Pričakovali smo, da bo izražanje gena višje v tumorskem tkivu preminulih bolnikov, saj bi to potrdilo višjo infiltracijo makrogafov M2 v poznejših stadijih tumorja, ter višjo oskrbo tumorskih celic s folati, kar bi lahko vodilo do agresivnejšega poteka bolezni ter smrti.

**Preglednica XII:** Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena *FOLR2* v tumorskem tkivu pri živih in pokojnih.

Parameter	Rezultati
Izražanje gena v tumorskem tkivu pri živih	2,14 {1,46/4,69} (0,53 – 6,82)
Izražanje gena v tumorskem tkivu pri pokojnih	2,32 {1,11/5,65} (0,13 – 10,10)

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

Izražanje gena *FOLR2* je standardizirano glede na izražanje hišnega gena *GUS*



**Slika 12:** Statistična analiza izražanja *FOLR2* v tumorskem tkivu živih in pokojnih bolnikov.

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

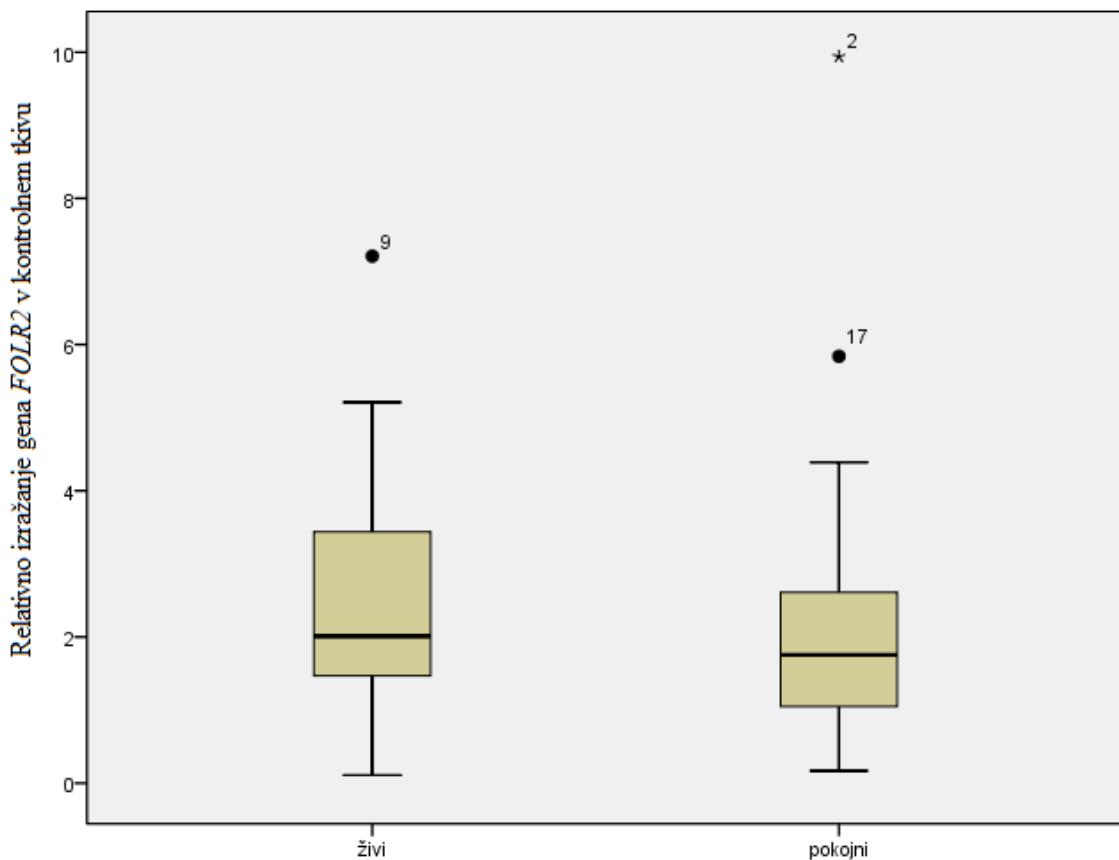
Za primerjavo smo nato naredili še deskriptivno analizo izražanja *FOLR2* v kontrolnem tkivu živih in pokojnih bolnikov. Vendar podatki tudi tu niso pokazali razlike (Preglednica XIII, Slika 13).

**Preglednica XIII:** Deskriptivna statistika relativnega izražanja gena *FOLR2* v kontrolnem tkivu pri živih in pokojnih.

Parameter	Rezultati
Izražanje gena v kontrolnem tkivu pri živih	2,01 {1,44/3,48} (0,11 – 7,21)
Izražanje gena v kontrolnem tkivu pri pokojnih	1,75 {0,87/3,14} (0,17 – 9,94)

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

Izražanje gena *FOLR2* je standardizirano glede na izražanje hišnega gena *GUS*



**Slika 13:** Statistična analiza izražanja *FOLR2* v kontrolnem tkivu živih in pokojnih bolnikov.

Slika prikazuje največjo in najmanjšo vrednost, kvartile ter mediano za posamezno skupino vzorcev ter tudi dva osamelca (\*), ki sta zunaj intervala  $Q_3 + 1,5Q$ .

#### 4.2.8 Prognostičen pomen izražanja *FOLR2* v tumorskem tkivu

Ker vemo, da je izražanje FR ponavadi povišano v različnih vrstah raka, je smiselno pričakovati, da bo njegovo izražanje povezano tudi s prognozo. Tudi v naši raziskavi smo proučili morebiten prognostičen pomen izražanja gena *FOLR2*. Coxova regresijska analiza je pokazala, da izražanje gena *FOLR2* v tumorskem in kontrolnem tkivu ni napovedovalo 4-letnega preživetja bolnika in torej nima prognostičnega pomena ( $p = 0,457$ ).

Raziskovalci v drugih študijah navajajo dejstvo, da višje izražanje FR korelira s slabšo prognozo. To je dokazano za izražanje FR $\alpha$  pri NSCLC (86), FR pri raku dojk (87) in FR $\beta$  pri glioblastomu (72). Povezave med FR $\beta$  in preživetjem NSCLC predhodno ni objavil še nišče. Naša raziskava ni potrdila hipoteze, da izražanje FR $\beta$  korelira z preživetjem oz. s slabšo prognozo. Kot vidimo že v poglavju 4.2.7 se izražanje gena *FOLR2* ni razlikovalo med preživelimi in pokojnimi 4 leta po operaciji. Preminuli bolniki (mediana = 1,90) imajo enako razmerje izražanja gena *FOLR2* (v tumorskem tkivu glede na kontrolo) v primerjavi z preživelimi bolniki (mediana = 1,07) 4 leta po operaciji;  $p = 0,5261$ . Razmerje izražanja gena *FOLR2* (v tumorskem tkivu glede na kontrolo) prav tako ne korelira s časom preživetja po operaciji ( $r = 0,0856$ ,  $p = 0,6045$ ).

Študija tumorskih makrofagov na NSCLC vzorcih je prav tako ovrgla povezavo med številom tumorskih makrofagov M2 ter slabšo prognozo. Ugotovili pa so povezavo med višjo gostoto tumorskih makrofagov M1 ter boljšo prognozo, kar si lahko razlagamo z dejstvom, da imajo makrofagi M1 protivnetno delovanje in tako zavirajo rast tumorja (26).

#### 4.2.9 Povezava med izražanjem *FOLR2* in drugimi geni v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu

V predhodnih raziskavah so na nivoju celotnega rakavega NSCLC tkiva in navidezno zdravega pljučnega tkiva istih bolnikov analizirali izražanje mnogih genov (rezultati analiz še niso objavljeni), zato smo njihov nivo izražanja primerjali tudi z izražanjem *FOLR2*.

Ugotovili smo, da:

- V tumorskem tkivu izražanje gena *FOLR2* korelira z izražanjem genov, za katere vemo, da se izražajo v makrofagih M2 (*CD163*, *SRA1*, *LPL*), ne korelira pa z geni, ki se ne izražajo v makrofagih M2.
- V kontrolnem tkivu *FOLR2* korelira z geni, ki se izražajo v makrofagih M2 (*CD163*, *SRA1*) in prav tako z geni, ki se izražajo v ostalih celicah kontrolnega tkiva (*FASN*, *LDL*, *SREBP1*, *SREBP2*), kot so npr. celice strome in same tumorske celice.

## **5 SKLEP**

V raziskavi smo želeli preučiti izražanje gena za folatni receptor  $\beta$  v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu.

Z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času smo izmerili izražanje gena *FOLR2* v tumorskem in v sosednjem netumorskem tkivu 40 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Ugotovili smo, da je izražanje gena *FOLR2* v tumorskem tkivu 32 % višje kot izražanje v kontrolnem tkivu, vendar razlika ni bila statistično signifikantna, zato smo zavrnili našo prvo hipotezo. Izražanje gena *FOLR2* v tumorskem in sosednjem navidezno zdravem pljučnem tkivu ni bilo povezano z nobenim drugim od opazovanih kliničnih podatkov bolnikov (stadij bolezni, histološki tip tumorja, izguba telesne teže, kajenje, preživetje) in nima prognostičnega pomena, zato smo zavrnili tudi drugo hipotezo.

Ker se folatni receptor  $\beta$  lahko nahaja v dveh oblikah, tako v funkcionalni in nefunkcionalni, bi za nadaljne ugotovitve bile potrebne še študije funkcionalnosti samega receptorja, saj je možno, da so v tumorskem tkivu receptorji aktivni, v kontrolnem pa neaktivni, čeprav v izražanju gena *FOLR2* med obema tkivoma ni signifikantnih razlik.

## 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: 385-390.
2. Global burden of cancer (elektronski vir). Dostopno na naslovu: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (citirano dne 7. 6. 2011).
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: 717-720.
6. Terčelj M: Zgodnje odkrivanje pljučnega raka. Radiology and oncology 2006; 40: 59-66.
7. An introduction to lung cancer (elektronski vir). Dostopno na naslovu: <http://cancergrace.org/lung/2010/04/05/an-introduction-to-lung-cancer/> (citirano dne 7. 6. 2011).
8. Lung cancer. The Immune Recovery Centers of America (elektronski vir). Dostopno na naslovu: <http://www.immunerecovery.net/Lung%20Cancer.html> (citirano dne 7. 6. 2011).
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: 2237-2246.
10. Ginsberg R, Roth J, Fergusson M: Lung cancer surgical practice guidelines. Society of Surgical Oncology practice guidelines. Oncology 1997; 11: 889-892.
11. Balkwill F, Mantovani A: Inflammation and cancer: back to Virchow? The Lancet 2001; 357: 539-545.
12. Kuper H, Adam HO: Infections as a major preventable cause of human cancer. Journal of Internal Medicine 2000; 248: 171-183.

13. Karin M, Lawrence T, Nizet V: Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 2006; 124: 823–835.
14. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N: Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research* 2002; 89: 191-199.
15. Saccett E, Weitzman SA: Chronic inflammation and cancer. *Oncology* 2002; 16: 217-226.
16. Coussens LM, Werb Z: Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860–867.
17. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A: Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005; 7: 211–217.
18. Pixley FJ, Stanley ER: CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in Cell Biology* 2004; 14: 628-638.
19. Gordon S, Taylor PR: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5: 953-963.
20. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 2004; 25: 676-686.
21. Mantovani A, Sica A, Locati M: New vistas on macrophage differentiation and activation. *European Journal of Immunology* 2007, 37:14-16.
22. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P: Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 2009; 68: 1065-1073.
23. Kawamura K, Kornohara Y, Takaishi K, Katabuchi H, Takeya M: Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathology International* 2009; 59: 300-305.
24. Condeelis J, Pollard JW: Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion and metastasis. *Cell* 2006; 124: 263-266
25. Sugai H, Kono K, Takahashi A, Ichihara F, Kawaida H, Fujii H, Matsumoto Y: Characteristic alteration of monocytes with increased intracellular IL-10 and IL-12 in patients with advanced-stage gastric cancer. *Journal of Surgical Research* 2004; 116: 277–287.
26. Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z: The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* 2010; 112: 2-9.

27. Fabriek BO, Dijkstra CD, van der Berg TK: The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* 2005; 210: 153-160.
28. Karin M, Greten FR: NF- $\kappa$ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5: 749–759.
29. Bando H, Toi M: Tumor angiogenesis, macrophages and cytokines. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2000; 476: 267-284.
30. Lewis JS: Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is upregulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *The Journal of Pathology* 2000; 192: 150-158.
31. Hiratsuka S: MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002; 2: 289-300.
32. Hilderbrand R: Urokinase plasminogen activator receptor (CD87) expression of tumor-associated macrophages in ductal carcinoma in situ, breast cancer and resident macrophages of normal breast tissue. *Journal of Leukocyte Biology* 1999; 66: 40-49.
33. Leek RD: Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *Journal of Pathology* 2000; 190: 430-436.
34. Hilderbrand R: Transforming growth factor- $\beta$  stimulates urokinase expression in tumor-associated macrophages of the breast. *Laboratory Investigation* 1998; 78: 59-71.
35. Pollard J.W: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4: 71-78.
36. Chen JJ, Yao PL, Yuan A, Hong TM, Shun CT, Kuo ML, Lee YC, Yang PC: Upregulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2003, 9:729-737.
37. Welsh TJ, Green RH, Richardson D, Waller DA, O'Byrne KJ, Bradding P: Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2005, 23: 8959-8967.
38. Leek, RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL: Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Research* 1996; 56: 4625–4629.
39. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Kamei T, Koike K, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Inoue M: Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with

- clinicopathological features in endometrial cancer. Anticancer Research 2004; 24: 3335–3342.
40. Folic acid (elektronski vir). Dostopno na: [http://en.wikipedia.org/wiki/Folic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Folic_acid) (citirano dne 10.6.2011).
41. Bajrović F, Bresjanac M, Grubič Z, Marš T, Ribarič S, Sketelelj J, Šuput D, Živin M: Seminarji iz patološke fiziologije. 1.izdaja, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2008: 40-41.
42. Matherly LH, Goldman DI: Membrane transport of folates. Vitamins and hormones 2003; 66: 403-456.
43. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E: Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. Cell 2006; 127: 917-928.
44. Zhao R, Min SH, Wang Y, Campanella E, Low PS, Goldman ID: A Role for the proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) in folate receptor-mediated endocytosis. The Journal of biological Chemistry 2009; 284 (7): 4267-4274.
45. Antony AC. Folate receptors. Annual Review of Nutrition 1996; 16: 501-521.
46. Doucette M, Stevens V: Point mutations alter the cellular distribution of the human folate receptor in cultured chinese hamster ovary cells. The Journal of Nutrition 2004; 134: 208-316.
47. Sadasivan E, Rothenberg SP: The complete amino acid sequence of a human folate binding protein from KB cells determined from the cDNA. The Journal of Biological Chemistry 1989; 264: 5806-5811.
48. Shen F, Ross JF, Wang X, Ratnam M: Identification of a novel folate receptor, a truncated receptor, and receptor type  $\beta$  in hematopoietic cells: cDNA cloning, expression, imunoreactivity, and tissue specificity. Biochemistry 1994; 33: 1209-1215.
49. Shen F, Ross JF, Wu M, Miller D, Ratnam M: Folate receptor type gamma is primarily a secretory protein due to lack of an efficient signal for glycosylphosphatidylinositol modification: protein characterization and cell type specificity. Biochemistry 1995; 34: 5660-5665.
50. Spiegelstein O, Eudy JD, Finnell RH: Identification of two putative novel folate receptor genes in humans and mouse. Gene 2000; 258: 117-125.

51. Elnakat H, Ratnam M: Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; 56: 1067-1084.
52. Shen F, Wang H, Zheng X, Ratnam M: Expression levels of functional folate receptors  $\alpha$  and  $\beta$  are related to the number of N-glycosylated sites. *Biochemical Journal* 1997; 327: 759-763.
53. Sudimack J, Lee RJ: Targeted drug delivery via the folate receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000; 41: 147–162.
54. Weitman SD, Weinberg AG, Coney LR, Zurawski VR, Jennings DS, Kamen BA: Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis. *Cancer Research* 1992; 52: 6708-6711.
55. Leamon CP, Low PS: Folate-mediated targeting: from diagnostics to drug and gene delivery. *Drug Discovery Today* 2001; 6: 44-51.
56. Ratnam M, Marquardt H, Duhring JL, Freisheim JH: Homologous membrane folate binding proteins in human placenta: Cloning and sequence of a cDNA. *Biochemistry* 1989; 28: 8249–8254.
57. Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M: Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues *in vivo* and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer* 1994; 73, 2432–2443.
58. Ross JF, Wang H, Behm FG, Mathew P, Wu M, Booth R: Folate receptor type  $\beta$  is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia. *Cancer* 1999; 85: 348–357.
59. Reddy JA, Haneline LS, Srour EF, Antony AC, Clapp DW, Low PS: Expression and functional characterization of the  $\beta$ -isoform of the folate receptor on CD34(+) cells, *Blood* 1999; 93: 3940– 3948.
60. Mantovani LT, Miotti S, Menard S, Canevari S, Raspagliesi, Bottini C, Bottero F, Colnaghi MI: Folate binding protein distribution in normal tissues and biological fluids from ovarian carcinoma patients as detected by the monoclonal antibodies MOv18 and MOv19. *European Journal of Cancer* 1994; 30A: 363– 369.
61. Pan XQ, Zheng X, Shi G, Wang H, Ratnam M., Lee RJ: Strategy for the treatment of acute myelogenous leukemia based on folate receptor  $\beta$ -targeted liposomal doxorubicin combined with receptor induction using all-trans retinoic acid. *Blood* 2002; 100: 594– 602.

62. Nakashima-Matsushita N, Homma T, Yu S, Matsuda T, Sunahara N, Nakamura T in sod.: Selective expression of folate receptor  $\beta$  and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2002; 42: 1609–1616.
63. Sun XL, Murphy BR, Li QJ, Gullapalli S, Mackins J, Jayaram HN: Transduction of folate receptor cDNA into cervical carcinoma cells using recombinant adenoassociated virions delays cell proliferation in vitro and in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 96: 1535–1547.
64. Figini M, Ferri R, Mezzanzanica D, Bagnoli M, Luison E, Miotti S: Reversion of transformed phenotype in ovarian cancer cells by intracellular expression of anti folate receptor antibodies. *Gene Therapy* 2003; 10: 1018–1025.
65. Antony AC, Tang YS, Khan R: Translational up-regulation of folate receptors is mediated by homocysteine via RNA-heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 interactions. *Journal of clinical investigation* 2004; 113(2): 285-301.
66. Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J: Vitamin B-12 status (homotranscobalamin II, methylmalonic acid) and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *The American Journal of clinical nutrition* 2003; 78: 131–136.
67. Niyikiza C, Baker SD, Seitz DE: Homocysteine and methylmalonic acid: markers to predict and avoid toxicity from pemetrexed therapy. *Molecular Cancer Therapeutics* 2002; 1: 545–552.
68. Hao H, Qi H, Ratnam M: Modulation of the folate receptor type  $\beta$  gene by coordinate actions of retinoic acid receptors at activator Sp1/ets and represor AP-1 sites. *Blood* 2003; 101: 4551-4560.
69. Folate receptor 2 (fetal) (elektronski vir). Dostopno na: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOLR2&search=folr2> (citirano dne 11.6.2011).
70. Puig-Kröger A, Sierra-Filardi E, Dominguez-Soto A: Folate receptor  $\beta$  is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer research* 2009; 69: 9395-9403.
71. Turk MJ, Waters DJ, Low PS: Folate-conjugated liposomes preferentially target macrophages associated with ovarian carcinoma. *Cancer Letters* 2004; 213: 165-172.
72. Nagai T, Tanaka M, Tsuneyoshi Y, Xu B, Michie SA in sod.. Targeting tumor-associated macrophages in an experimental glioma model with a recombinant

- immunotoxin to folate receptor  $\beta$ . *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2009; 58: 1577-1586.
73. Hilgenbrink A, Low P: Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics. *Journal of pharmaceutical sciences* 2005; 94: 2135-2146.
74. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK in sod.: *World Health Organization Classificaton of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon, France: IARC Press; 2004.
75. Sabin LH, Wittekind C: *TNM Classification of Malignant Tumors*. 6 th ed Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2002.
76. Sorscher DH: DNA amplification techniques. In: Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular diagnostics for the clinical laboratorian*. Totowa: Humana Press 1997: 89-101.
77. Louie M, Louie L, Simor AE: The role of DNA amlification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ* 2000; 163: 301-309.
78. Rohlfs EM, Highsmith WE: PCR-based methods for mutation detection. *Molecular diagnostics for the clinical laboratorian*. Totowa: Humana Press 1997: 123-162.
79. Innis MA, Gelfand DH: Optimization of PCRs. *PCR protocols: a guide to methods and amplifications*. San Diego: Academic Press Inc., 1990: 3-12.
80. Ginzinger DG: Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30: 503-512.
81. Mackay IM: Real-time PCR in microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection* 2004; 10: 190-212.
82. Bustin SA: Absolute quantification of mRNAusing real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000; 25; 169-193.
83. Foy CA, Parkers HC: Emerging homogeneus DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry* 2001; 47: 990-1000.
84. AppliedBiosystems, TaqMan® and SYBR® GreenChemistries(elektronski vir). Dostopno na: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html> (citirano dne 20.6.2011)

85. Parker N, Turk MJ, Elaine W, Lewis JD, Low PD, Leamon CP: Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Analytical Biochemistry* 2005; 338: 284-293.
86. Sonobe M, Nagai S, Hirata T, Wada H, Miyahara R: Expression status of folate receptor alpha is significantly correlated with prognosis in non-small-cell lung cancers. *Annals of surgical oncology* 2008; 15 (3): 889-899.
87. Keeney GL, Lingle WL, Christianson TJ, Varghese B, Hillman D, Oberg AL, Low PS: Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer. *International Journal of Cancer* 2007; 121 (5): 938-942.