

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA TOMAŽIČ

DIPLOMSKA NALOGA

**PREUČEVANJE IZRAŽANJA GENA ZA PROTEIN
SPOT 14 V NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM
RAKAVEM TKIVU**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA TOMAŽIČ

DIPLOMSKA NALOGA

**PREUČEVANJE IZRAŽANJA GENA ZA PROTEIN
SPOT 14 V NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM
RAKAVEM TKIVU**

**STUDY OF SPOT 14 PROTEIN GENE EXPRESSION IN
NON-SMALL CELL LUNG CANCER TISSUE**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

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 Černe za strokovno pomoč, trud in dragocene nasvete pri pisanju diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za pomoč in prijaznost pri delu v laboratoriju.

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

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

IZJAVA

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

Petra Tomažič

Ljubljana, marec 2012

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj

Član komisije: asist. dr. Tihomir Tomažič

KAZALO

KAZALO	I
KAZALO SLIK.....	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
1 UVOD	1
1.1 PLJUČNI RAK	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 (TNM = Tumor Node Metastasis)	4
1.2 MEHANIZMI PRESKRBE RAKAVEGA TKIVA Z VIŠJIMI MAŠČOBNIMI KISLINAMI	8
1.2.1 Eksogeni mehanizmi	9
1.2.1.1 Lipoproteinska lipaza	9
1.2.1.2 Apolipoprotein E	9
1.2.1.3 LDL receptor	10
1.2.1.4 Receptorji čistilci.....	10
1.2.2 Endogeni mehanizmi	11
1.2.2.1 ATP citrat liaza.....	11
1.2.2.2 Acil-CoA sintetaza	11
1.2.2.3 Sintaza višjih maščobnih kislin (FASN)	11
1.2.2.4 Spot 14 (S14).....	12
1.3 SPOT 14 (S14)	12
1.3.1 Kaj je SPOT 14 (S14).....	12
1.3.2 Izražanje in delovanje Spot 14	14
1.3.3 Ščitnični hormon in glukoza uravnavata delovanje S14 proteina	14
1.3.4 CLA (konjugirana linolna kislina) zavira izražanje S14 in FASN genov pri raku dojke in liposarkomu	15
1.3.5 Izražanje proteina S14 v jetrih je regulirano s CAR	16
1.3.6 Vloga večkrat nenasičenih maščobnih kislin (PUFA) v jetrni lipogenezi preko SREBP1c	17
1.3.7 Gen S14 pri raku dojke	18
1.3.8 Izražanje S14 v hepatocitih	19
2 NAMEN DELA.....	21
3 MATERIALI IN METODE	22
3.1 IZBIRA BOLNIKOV IN VZORCI.....	22
3.2 MATERIALI IN APARATURE.....	22
3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (PCR).....	23
3.3.1 Optimizacija pogojev PCR.....	23
3.3.2 Princip metode.....	25
3.3.3 Potek reakcije PCR v realnem času.....	30
3.3.4 Analiza rezultatov	33
3.4 ZANESLJIVOST POSTOPKA IN PRIPOROČILA	34
3.5 STATISTIČNA ANALIZA	35
4 REZULTATI.....	36

4.1 KLINIČNI PODATKI O BOLNIKIH	36
4.2 REZULTATI MERITEV IZRAŽANJA SPOT 14 (S14)	38
4.2.1 Primerjava in povezava izraženosti gena <i>Spot 14</i> v tumorskem in zdravem tkivu	40
4.2.2 Korelacija med izražanjem <i>Spot 14</i> v tumorskem in kontrolnem tkivu	43
4.2.3 Izražanje gena <i>Spot 14</i> v tumorskem tkivu glede na stadij bolezni.....	44
4.2.4 Izražanje gena <i>Spot 14</i> v tumorskem tkivu glede na histološki tip bolezni	47
4.2.5 Primerjava izraženosti gena <i>Spot 14</i> v tumorskem tkivu glede na izgubo telesne teže	49
4.2.6 Primerjava izraženosti gena za <i>Spot 14</i> v tumorskem tkivu glede na kajenje.....	51
4.2.7 Primerjava izraženosti gena <i>Spot 14</i> v tumorskem in kontrolnem tkivu pri preživelih in pokojnih udeležencih 4 leta po operaciji.....	54
4.2.8 Primerjava izraženosti gena <i>Spot 14 T/K</i> v skupini pokojnih udeležencev glede na čas preživetja	58
4.2.9 Primerjava prisotnosti gena <i>Spot 14 T/K</i> glede na poročanje udeležencev o hujšanju v zadnjih treh mesecih.....	61
4.2.10 Primerjava izraženosti gena <i>Spot 14 T/K</i> glede na stadij bolezni	63
4.2.11 Prognostični pomen izražanja gena <i>Spot 14</i> v tumorskem tkivu	65
4.2.12 Primerjava izražanja gena <i>Spot 14</i> in gena <i>FASN</i>	65
5 SKLEP	67
6 LITERATURA	68

KAZALO SLIK

Slika 1: Histološki tipi pljučnega raka	3
Slika 2: Položaj gena S14 na kromosomu 11.....	13
Slika 3: Kristalna struktura monomera S14 (A) in homodimera (B).....	13
Slika 4: Prikaz krivulje jakosti fluorescence v odvisnosti števila ciklov pri PCR v realnem času.....	27
Slika 5: Princip delovanja PCR v realnem času s sondo TaqMan.	29
Slika 6: Grafični prikaz statistične analize izraženosti gena <i>S14</i> v kontrolnem in tumorskem tkivu.....	42
Slika 7: Statistična analiza izraženosti gena <i>S14</i> v obolelem tkivu glede na različne stadije tumorske bolezni.	45
Slika 8: Statistična analiza izraženosti gena <i>S14</i> v obolelem tkivu glede na različne histološke tipe.....	48
Slika 9: Statistična analiza izraženosti gena <i>S14</i> v obolelem tkivu glede na izgubo telesne teže 1-3 mesece pred operacijo.....	50
Slika 10: Statistična analiza izraženosti gena <i>S14</i> v obolelem tkivu glede na kajenje.....	52
Slika 11: Statistična analiza izraženosti gena <i>S14</i> v obolelem tkivu pri preživelih in pokojnih bolnikih 4 leta po operaciji.....	55
Slika 12: Statistična analiza izraženosti gena <i>S14</i> v kontrolnem tkivu pri preživelih in pokojnih bolnikih 4 leta po operaciji.....	57
Slika 13: Statistična analiza izraženosti <i>S14</i> T/K pri pokojnih bolnikih glede na čas spremeljanja.	60
Slika 14: Statistična analiza izraženosti <i>S14</i> T/K glede na poročanje o hujšanju v zadnjih treh mesecih.....	62
Slika 15: Statistična analiza izraženosti <i>S14</i> T/K glede na stadij bolezni.	64

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Značilnosti histoloških tipov pljučnih rakov.....	4
Preglednica II: Klasifikacija pljučnega raka TNM.....	5
Preglednica III: Klasifikacija po stadijih TNM.....	7
Preglednica IV: Volumni sestavin za reakcijsko raztopino.	31
Preglednica V: Volumni sestavin za končno raztopino, ki smo jo analizirali s PCR v realnem času.....	31
Preglednica VI: Klinične značilnosti in laboratorijski rezultati bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom.	36
Preglednica VII: Rezultati meritev mRNA tarčnega gena S14, hišnega gena GUS, normalizacija S14, glede na izražanje GUS, relativno izražanje S14 ter razmerje izražanja S14 v kontrolnem in tumorskem tkivu	38
Preglednica VIII: Primerjava izraženosti gena S14 v obolelem in zdravem tkivu.	41
Preglednica IX: Korelacija prisotnosti gena S14 v obolelem in kontrolnem tkivu.....	43
Preglednica X: Primerjava izraženosti gena S14 v tumorskem tkivu glede na stadij bolezni.	44
Preglednica XI: Primerjava izraženosti gena S14 v tumorskem tkivu glede na histološki tip.	47
Preglednica XII: Primerjava izraženosti gena S14 v obolelem tkivu glede na izgubo telesne teže.	49
Preglednica XIII: Korelacija prisotnosti gena S14 v obolelem tkivu in količino izgubljene teže v kg.	51
Preglednica XIV: Primerjava izraženosti gena S14 v obolelem tkivu glede na kajenje.	52
Preglednica XV: Korelacija prisotnosti gena S14 v obolelem in trajanjem kajenja v letih.	53
Preglednica XVI: Primerjava izraženosti gena S14 v obolelem tkivu pri preživelih in pokojnih bolnikih 4 leta po operaciji.....	54
Preglednica XVII: Primerjava izraženosti gena S14 v kontrolnem tkivu pri preživelih in pokojnih bolnikih 4 leta po operaciji.....	56
Preglednica XVIII: Primerjava izraženosti gena S14 T/K v skupini pokojnih udeležencev, glede na čas preživetja.....	59
Preglednica XIX: Korelacija prisotnosti gena S14 T/K pri pokojnih bolnikih in časom spremjanja le-teh.	61
Preglednica XX: Primerjava izraženosti gena S14 T/K glede na poročanje o hujšanju v zadnjih treh mesecih.	62
Preglednica XXI: Primerjava izraženosti gena S14 T/K glede na stadij bolezni.	64

POVZETEK

Nedrobnocelični pljučni rak (NSCLC) je najpogostejši vzrok umrljivosti zaradi rakavega obolenja svetu. Z namenom iskanja novih načinov zdravljenja nedrobnoceličnega pljučnega raka so preučili že različne mehanizme preskrbe rakavega tkiva z maščobnimi kislinami. Raziskave so bile narejene z lipoproteinsko lipaz (LPL), sintazo višjih maščobnih kislin (FASN), LDL receptorjem in apolipoproteinom E (Apo E). Pri preskrbi rakavega tkiva z maščobnimi kislinami sodeluje tudi protein Spot 14 (S14). S14 uravnava izražanje encimov za sintezo višjih maščobnih kislin tako v normalnih kot tudi malignih celicah. Njegovo zvišano izražanje zagotavlja zvečano sintezo lipidov v tumorjih, kot je npr. rak dojke.

V okviru diplomske naloge smo preučevali izražanje gena *S14* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu in sosednjem, navidezno zdravem, pljučnem tkivu istega bolnika. Glede na že izvedene raziskave o LPL, sintazi višjih maščobnih kislin, LDL receptorja, Apo E in SREBF1 (od sterola odvisen regulatorni element vezoviči protein 1c) ter glede na že zapisane podatke o imunohistokemičnih določitvah proteina S14 pri raku dojke smo predvidevali, da je izražanje gena *S14* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu više kot v kontrolnem tkivu istega bolnika. Poleg tega smo predvidevali tudi, da je izražanje gena *S14* povezano vsaj s katerim od opazovanih kliničnih podatkov bolnika (stadij bolezni, histološki tip tumorja, izguba telesne teže bolnika pred operacijo, število let kajenja, 4-letno preživetje bolnikov).

Z uporabo metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času smo izmerili izražanje gena *S14* v tumorskem in v sosednjem netumorskem, navidezno zdravem, tkivu 41 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Izražanje *S14* v kontrolnem tkivu je bilo, v nasprotju z našimi pričakovanji, 1,58-krat više v kontrolnem kot v rakavem tkivu (mediana tumorskih vzorcev 9,82 proti mediana kontrolnih vzorcev 15,52; $p = 0,007$). Izražanje gena *S14* v rakavem in kontrolnem tkivu ni bilo povezano z nobenim od opazovanih kliničnih podatkov bolnikov ter ni imelo prognostičnega pomena. Ugotovili pa smo, da je izražanje gena *S14* koreliralo z izražanjem gena *FASN* v kontrolnem tkivu ($p < 0,0001$) in v tumorskem tkivu ($p = 0,0367$).

Rezultate naše raziskave je težko primerjati z rezultati predhodnih raziskav, saj *S14* v pljučnem rakavem tkivu še ni bil izmerjen.

Poleg izražanja gena *S14* bi bilo v prihodnje smiselno izmeriti tudi njegovo imunoreaktivnost, in sicer istočasno v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu in nerakavem pljučnem tkivu istega bolnika.

ABSTRACT

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the leading cause of mortality due to cancer causes in the world. With a view to finding new treatments for non-small cell lung cancer, the different mechanisms of supply of cancerous tissues with fatty acids have already been studied. Studies were performed with lipoprotein lipase (LPL), fatty acid synthase (FASN), LDL receptor and apolipoprotein E (Apo E). Protein Spot 14 (S14) is also involved in the supply of cancerous tissue with fatty acids. S14 regulates expression of enzymes for the synthesis of fatty acids in both normal as well as malignant cells. Its elevated expression provides an increased lipid synthesis in tumors, like breast cancer.

In the thesis, we studied the expression of gene *S14* in non-small cell lung cancer tissue and adjacent, apparently healthy lung tissue of the same patient. According to the research conducted on LPL, fatty acid synthase, LDL receptor, Apo E and SREBF1 (sterol regulatory element binding protein-1c), and according to the literature data on the immunohistochemical determinations S14 protein in breast cancer, we assumed that the *S14* gene expression is higher in non-small cell lung cancer tissue than in control tissue of the same patient. In addition, we also assumed that the *S14* gene expression is associated at least with any of the observed patient clinical data (clinical stage of disease, histologic tumor type, weight loss patient before surgery, years of smoking, 4-year survival).

By using the technique of real-time polymerase chain reaction, we measured the *S14* gene expression in tumor and adjacent non-cancer, apparently healthy tissue of 41 patients with non-small cell lung cancer. Expression of *S14* was contrary to our expectations, 1.58 times higher in control tissue than in cancer tissue (median tumor samples 9.82 against control samples 15.52, $p = 0.007$). *S14* gene expression in cancer and control tissue was not associated with any of the observed clinical data of patients and had no prognostic significance. We found that the *S14* gene expression correlated with the expression of *FASN* gene in the control tissue ($p < 0.0001$) and in tumor tissue ($p = 0.0367$).

The results of our study are difficult to compare with the results of previous research, as *S14* in lung cancer tissue had not yet been measured.

In addition to the *S14* gene expression, in the future it would be reasonable to measure its immunostained activity in non-small cell lung cancer tissue and at the same time in non-cancer lung tissue of the same patient.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACC	Acetil-CoA karboksilaza
ACLY	ATP citrat liaza
ACS	acetil-CoA sintetaza
Apo E	apolipoprotein E
BMI	indeks telesne mase (ang. body mass index)
CAR	konstitutivni androstan receptor
CAT	kloramfenikol acetil transferaza
CoA	koencim A
CLA	konjugirana linolna kislina
Ct	cikel qPCR, kjer fluorescenza preseže nastavljeni prag
cDNA	komplementarna DNA
DNA	deoksiribonukleinska kislina
FASN	sintaza višjih maščobnih kislin
<i>FASN</i>	gen, ki kodira sintazo višjih maščobnih kislin
GUS	β -glukuronidaza
IDL	lipoprotein srednje gostote
LDL	lipoprotein nizke gostote
LPL	lipoproteinska lipaza
LPK	L-piruvat kinaza
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NSCLC	nedrobnocelični pljučni rak (ang. non-small cell lung cancer)
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (ang. quantitative polymerase chain reaction)
PXR	pregnan X receptor
PPAR α	peroksisomski rastni aktivatorski receptor alfa
PUFA	večkrat nenasicene maščobne kisline
SCC	ploščatocelični rak (ang. squamous cell cancer)
SD	standardna deviacija
SPOT 14	protein, poznan tudi kot S14, Lpgp (lipogenic protein 1), LPGP1, MGC21659, THRSP (thyroid hormone responsive)

<i>SPOT 14</i>	gen, poznan tudi kot <i>S14</i> , <i>Lpgp</i> (lipogenic protein 1), <i>LPGP1</i> , <i>MGC21659</i> , <i>THRSP</i> (thyroid hormone responsive)
SREBP-1c	od sterolov odvisni regulatorni element vezavni protein 1c (ang. sterol regulatory element binding protein-1c)
TNM	tumor, bezgavke, metastaze (ang. tumor , lymph nodes , metastases)
VLDL	lipoprotein zelo nizke gostote
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World health organization)

1 UVOD

1.1 PLJUČNI RAK

1.1.1 Epidemiologija pljučnega raka

Pljučni rak je eden izmed pogostejših rakavih bolezni v svetu, Evropi in 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 sprožilci kancerogeneze (npr. benzopireni, dibenzoantracen), ki povzročijo mutacije in s tem trajno okvaro DNA, promotorji kancerogeneze (npr. derivati fenola) ter nitrozamini. Pomembna sta tudi čas kajenja in število pokajenih cigaret. Po oceni WHO (ang. World health organization) na svetu kadi 47 % moških in 12 % žensk starejših od 15 let. Zakaj se rak razvije le pri 10-20 % kadilcev, ni znano, zato vse 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 tudi 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, bisklorometil 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, kjer je dejavnik tveganja preko 50). 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 neprezračenih prostorih.

Omenjajo tudi vpliv hormonov, raznih zdravil, hrane z veliko vsebnostjo maščob, virusnih okužb (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), pljučna fibroza, tuberkuloza in kovinska tuja telesa.

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

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

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

1.1.3 Histološka razvrstitev in patološke značilnosti pljučnih tumorjev

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

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

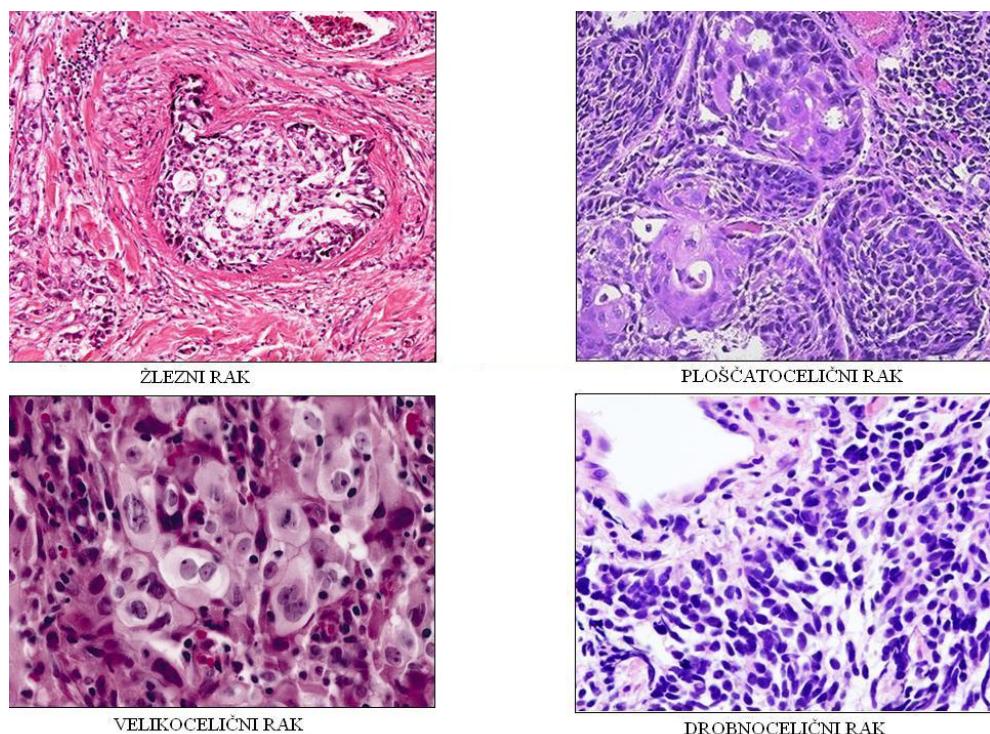
Najpogostejsa oblika raka na pljučih je **nedrobnocelični** rak pljuč (non-small cell lung cancer – NSCLC). Takšno obliko raka ima več kot 75 % vseh bolnikov s pljučnim

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 zelo različno obnašajo, je zdravljenje različno. Prve zdravimo predvsem s kemoterapijo in obsevanjem, druge, ki dlje časa ostajajo lokalizirani, pa kirurško. Ostali, manj pogosti, tumorji v pljučih so še: karcinoid, limfom, adenom, bronhioloalveolarni karcinom, ki je oblika žleznegraha, hematom, sarkom in nenazadnje metastaze primarnih tumorjev od drugod (4, 6).



Slika 1: Histološki tipi pljučnega raka. (7)

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

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

1.1.4 TNM klasifikacija (TNM = Tumor Node Metastasis)

Razširjenost (zamejenost) oz. stadij bolezni je najpomembnejši napovedni dejavnik. Določamo jo s pomočjo TNM klasifikacije, kjer stopnje T 1 – 4 pomenijo različno velikost primarnega tumorja in način rasti v okolico, oznake NX, 0, 1, 2 povedo o morebitnih zasevkih v področne oddaljene bezgavke, oznake MX, 0, 1 pa o zasevkah v parenhimske organe. Zadnja revidirana klasifikacija TNM pljučnega raka je v veljavi od leta 1997. Prikazana je v Preglednici II. Za dosledno in pravilno uporabo te klasifikacije velja poudariti naslednje: satelitski tumor v istem pljučnem režnju, kjer je najden primarni tumor, je T4; če je metastaza v drugem pljučnem režnju kot primarni tumor, je to M1; karcinoza plevre oz. perikarda je T4 ne glede na to, kako velik je sicer primarni tumor in v katerem režnju se nahaja; zasevki v istostranskih mediastinalnih in subkranialnih bezgavkah so N2; zasevki v skalenusnih in supraklavikularnih bezgavkah so N3, v drugih vratnih, vseh ostalih perifernih in trebušnih bezgavkah pa M1.

Kombinacije po klasifikaciji TNM so razdeljene na štiri stadije, ki se označujejo z rimskimi številkami. Prvi trije stadiji se delijo na A in B podstadije (prikazano v

Preglednici III). Razporeditev po stadijih v praksi omogoča primerjavo rezultatov zdravljenja, ki bi bili glede na številne možnosti TNM kombinacij preveč razdrobljeni (9).

Sedanja zamejitev TNM je prilagojena predvsem potrebam kirurgije. Stadij T4 pomeni tumor, ki ni primeren za resekcijo ne glede na to, ali gre za T4 zaradi vraščanja v mediastinalne organe ali za karcinozo plevre. Pri izboru nekirurškega zdravljenja, obsevanja oz. kemoterapije pa to ni vseeno. Tumorje T4 je mogoče obsevati z radikalnim odmerkom, če gre za vraščanje v mediastinum. Če gre za T4 zaradi karcinoze plevre, tumor ni primeren za radikalno obsevanje oz. je primeren kvečjemu za obsevanje s paliativnim odmerkom, ker je za obsevanje z radikalnimi odmerki bolj pomemben volumen področja, ki ga je potrebno obsevati, kot pa stadij T in N (10). Razširjenost primarnega tumorja, torej T stadij, ki je sicer neodvisen napovedni dejavnik pri operiranih bolnikih z nedrobnoceličnim rakom, se ni pokazal kot odločilen pri bolnikih zdravljenih z obsevanjem v kombinaciji s kemoterapijo ali brez nje (11).

Preglednica II: Klasifikacija pljučnega raka TNM. (9, 12)

<i>T (primarni tumor)</i>	
TX	Primarnega tumorja z bronhoskopskimi in slikovnimi metodami ne moremo dokazati, rakave celice so prisotne v sputumu ali bronhialnem izpirku.
T0	Ni znakov primarnega tumorja.
TIS	Karcinom in situ.
T1	Bronhialni tumor v lobarnem bronhiju, manjši od 3 cm.
T2	Tumor večji od 3 cm, ali raste v glavnem bronhiju vsaj 2 cm distalno od glavne karine, ali raste v visceralno plevro, ali povzroča atelektazo oz. 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, poziralnik, hrbtenico, v glavno karino), ali zaseva v isti pljučni reženj, ali povzroča maligni plevralni izliv.

<i>N (bezgavke)</i>	
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 subkranialne bezgavke.
N3	Zasevanje v hilusne, mediastinalne bezgavke nasprotne strani ali v bezgavke vratne skalenske mišice ali supraklavikularne bezgavke na isti ali drugi strani pljuč.
<i>M (oddaljeni zasevki)</i>	
MX	Oddaljenih zasevkov ne moremo opredeliti.
M0	Oddaljenih zasevkov ni.
M1	Zasevki v parenhimske organe ali zasevek pljučnega tumorja v drugi pljučni reženj.
<i>R (ostanek tumorja po operaciji)</i>	
R0	Brez zaznanega ostanka bolezni po operaciji.
R1	Mikroskopski ostanek tumorja po operaciji.
R2	Makroskopsko neradikalna operacija.

Preglednica III: Klasifikacija po stadijih TNM. (12)

STADIJ	T	N	M
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
	T3	N0	M0
Stadij IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Stadij IIIB	Vsi T	N3	M0
	T4	Vsi N	M0
Stadij IV	Vsi T	Vsi N	M1

Prizadetost področnih bezgavk ne določa samo napovedi izida, ampak tudi odstranljivost: metastaze N1 so odstranljive, metastaze N3 pa praviloma ne. Pri metastazah N2 ni določenih merit, kdaj so odstranljive in kdaj ne, ker sedanja klasifikacija ne upošteva velikosti, števila in tudi ne priraščenosti na organe v okolini (13). Raznovrstnost stadija IIIA-N2 je vzrok za širok razpon ugotovljenega preživetja bolnikov v tem stadiju. Petletno preživetje bolnikov kliničnega stadija IIIA, pri katerih je bila ugotovljena prizadetost N2 bezgavk pred operacijo, je bilo samo 2 %, če pa so bile najdene slučajno oz. nepričakovano pri operaciji, pa od 15 % do 30 % (14). To potrjujejo tudi slovenske izkušnje (15): pri 74 radikalno reseciranih bolnikih stadija IIIA-N2 v obdobju 1988-92, pri katerih so bile

odkrite metastaze N2 šele po operaciji, je bilo petletno preživetje 28 %. AJCC (American Joint Committee on Cancer) (16) dodatno priporoča k stadiju pTNM še določitev R. Če sega tumor do resekcijskega roba, je verjetno, da je ostal ostanek (residuum) tumorja v telesu. To dodatno označimo kot R1. Če pa je že operater ocenil, da dela tumorja ni odstranil, je to R2. Z R0 označujemo radikalno resekcijo in z RX takrat, kadar ni mogoče ocenjevati morebitnega ostanka tumorja.

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 ozdravljeni s kirurško resekcijo. V II. stadiju bolezni pada 5-letna stopnja preživetja na 40 % in v stadiju IIIA znaša le še 10-40 %. S kirurško resekcijo so lahko ozdravljeni samo nekateri bolniki s stadijem IIIB in IV (samotni zasevki) (17).

1.2 MEHANIZMI PRESKRBE RAKAVEGA TKIVA Z VIŠJIMI MAŠČOBNIMI KISLINAMI

Za vzpostavitev učinkovite strategije v molekularni terapiji raka je bistvenega pomena opredelitev značilnosti bolezni in odkritje načinov za izbiro selektivne tarče. Ena od pomembnih značilnosti raka je spremenjena presnova. Otto Warburg je v 20-ih letih 20. stoletja prvi opazil povečano anaerobno glikolizo pri raku. Zvišan glukozni katabolizem ustvarja presežek glikolitičnega končnega produkta, piruvata. Večina piruvata se pretvorí v laktat, nekaj laktata pa se nato pretvorí v acetil-CoA, ki se uporablja pri *de novo* sintezi maščobnih kislin. Hitro deleče rakave celice za izgradnjo membrane potrebujejo za *de novo* sintezo maščobnih kislin nenehno preskrbo z lipidi. Sintetizirane maščobne kisline se uporabljajo tudi za proizvodnjo energije s pomočjo β -oksidacije in lipidno modifikacijo beljakovin. Večina normalnih človeških tkiv za sintezo novih strukturnih lipidov prednostno uporablja lipide iz prehrane (eksogene), kajti *de novo* (endogena) sinteza maščobnih kislin je običajno zavrta in izražanje FASN (gen za sintazo višjih maščobnih kislin) je na nizki ravni. V rakavih celicah pa je *de novo* sinteza maščobnih kislin običajno zvišana in od nje je zelo odvisna preskrba celičnih maščobnih kislin (18, 19).

Čeprav se poti, ki vodijo do izboljšane preskrbe tumorskih celic z višjimi maščobnimi kislinami, razlikujejo od tistih v netumorskih celicah, pa so mehanizmi pridobivanja v večini primerov enaki: s sintezo, v kateri so udeleženi različni encimi

(sintaza višjih maščobnih kislin, lipoproteinska lipaza) ali s pomočjo membranskih receptorjev (LDL receptor, receptorji čistilci). Zvečano izražanje genov, zvišane aktivnosti encimov in višje število membranskih receptorjev so nekateri izmed dejavnikov, ki ločujejo tumorske celice od netumorskih. Izkorščamo jih v diagnostiki, prognozi in tudi terapiji rakavih obolenj (19).

1.2.1 Eksogeni mehanizmi

1.2.1.1 Lipoproteinska lipaza

Lipoproteinska lipaza (LPL) je poglavitni encim znotrajžilne presnove trigliceridov. Sintetizira se v parenhimskih celicah mnogih tkiv, od kjer se prenese na površino endotelija. Fiziološka aktivnost LPL je hidroliza trigliceridnih preostankov na lipoproteinih, bogatih s triglyceridi (hilomikroni in VLDL), ter sposobnost integriranja z lipoproteini neodvisno od njihove lipolizne aktivnosti, kar omogoča encimu, da veže lipoproteine na steno žilja. Prav tako vpliva na selektiven privzem lipofilnih vitaminov (A, E) brez hkratnega privzema ostalih sestavin lipoproteina (20).

Tkivno specifično uravnavanje sinteze in s tem aktivnost LPL v tkivu omogoča tkivom z velikimi presnovnimi potrebami učinkovito črpanje maščob iz krvi. Nekatere raziskave nakazujejo povezavo med LPL in rastjo rakavega tkiva (21).

1.2.1.2 Apolipoprotein E

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

Raziskave v zadnjem času kažejo na povišano izražanje gena za Apo E pri raku pljuč, raku na jajčnikih, prostati, debelem črevesju, dojki in pankreasu. Vendar pa po doslej znanih podatkih visoko izražanje Apo E ni dokazano povezano s stadijem raka, histološkim tipom tumorja ali preživetjem bolnika (22).

1.2.1.3 LDL receptor

Receptor za lipoprotein nizke gostote je transmembranski protein, ki posreduje pri endocitozi s holesterolom bogatega LDL. Izražanje LDL receptorja je v normalnih tkivih regulirano prek negativne povratne zanke z LDL. Pri tumorskem tkivu pa je ta zanka okvarjena. Okvarjeno uravnavanje omogoča tumorskim celicam privzem velikih količin maščobnih kislin, kar omogoči preskrbo celic z dodatnim virom energije ter strukturnimi molekulami za pospeševanje nekontrolirane rasti tumorjev.

Zvišano izražanje LDL receptorjev je potencialna tarča protitumornih učinkovin, saj bi se te učinkovine zaradi razlik v izražanju receptorjev pri tumorskih in normalnih celicah specifično in bolj učinkovito vezale na tumorske celice (23).

1.2.1.4 Receptorji čistilci

Receptorji čistilci so velika skupina strukturno različnih molekul, ki so vpletene v niz funkcij. Na podlagi njihove strukture so razvrščeni v osem različnih razredov (razred A, B, C, D, E, F, G in H), v skladu s klasifikacijo, ki jo predlaga Krieger in sodelavci (24).

Izražajo jih mieloidne celice, izbrane endotelijske celice in nekaj epitelnih celic. Prepoznajo različne ligande, vključno z mikrobiološkimi patogeni, kot tudi endogene in pridobljene molekule (25).

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

1.2.2 Endogeni mehanizmi

1.2.2.1 ATP citrat liaza

Protein ATP citrat liaza (ACLY), ki ga kodira gen *ACLY*, katalizira pretvorbo citrata v citosolni acetil-CoA, s čimer sodeluje v sintezi maščobnih kislin. Poročali so o zvišanem izražanju in aktivnosti *ACLY* v rakavih celicah. Zaviranje *ACLY* vodi do signifikantnega poslabšanja od glukoze odvisne lipidne sinteze. Poleg tega zaviranje *ACLY* z siRNA ali selektivnim zaviralcem SB-204990 zavira rast in preživetje tumorskih celic *in vitro* in *in vivo*. Čeprav molekularni mehanizmi celične smrti, ki je odvisna od zaviranja *ACLY*, še niso pojasnjeni, dosedanje raziskave nakazujejo, da bi ta encim lahko bil tarča v protitumorni terapiji (18).

1.2.2.2 Acil-CoA sintetaza

Acil-CoA sintetaza (ACS) je encim, ki pretvarja višje maščobne kisline v acil-CoA. Ta reakcija je pomemben korak v mnogih lipidnih presnovnih poteh, vključno z biosintezo fosfolipidov in triacilglicerola, β -oksidacijo in lipidno modifikacijo celičnih proteinov. V sesalcih obstaja pet izoblik ACS (*ACSL1, 3, 4, 5* in *6*). Študije s specifičnim zaviralcem encima ACS so razkrile, da zaviranje ACS sproži selektivno apoptozo v rakavih celicah po poti posredovani preko mitohondrijev. Ti podatki kažejo, da ACS sodeluje pri preživetju tumorskih celic in da bi bilo zaviranje ACS učinkovita strategija za zdravljenje raka. Trenutno še ni jasno, zaviranje katerega dela ACS bi povzročilo najbolj selektivno tumorsko celično smrt. Za pojasnitev vloge vsake ACS izoblike v normalnih in rakavih celicah so potrebne dodatne raziskave (18).

1.2.2.3 Sintaza višjih maščobnih kislin (FASN)

Maščobne kisline so bistvene sestavine vseh bioloških membran in predstavljajo pomembno obliko shranjevanja energije v živalih in rastlinah, zato se njihova biosinteza pojavlja v vseh živih organizmih. Od vseh lipogenih encimov v sintezni poti višjih maščobnih kislin najboljšo možnost tarčnega zdravljenja ponuja FASN, saj je edini encim

sesalcev, ki je sposoben *de novo* sinteze maščobnih kislin in zvišano izražen v večini človeških karcinomov (19, 27).

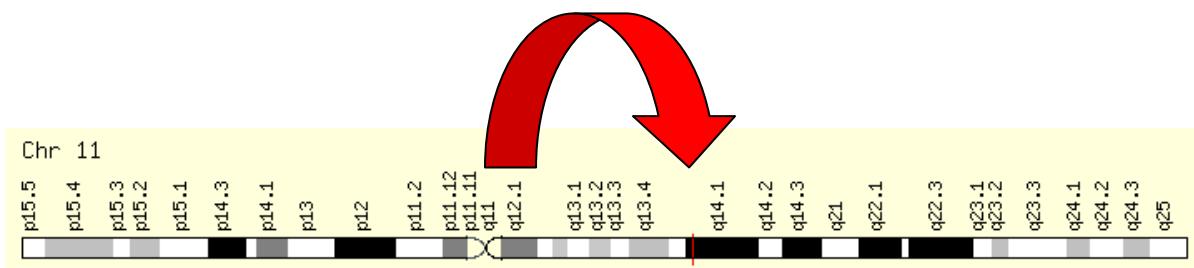
1.2.2.4 Spot 14 (S14)

Spot 14 (S14) je majhen, kisel jedrni protein, značilen za jetra, maščevje in mlečne žlezne med laktacijo. V mlečnih žlezah je odgovoren za proliferacijo epitelija in produkcijo mleka. Ker S14 uravnava izražanje encimov za sintezo višjih maščobnih kislin, njegovo zvišano izražanje zagotavlja zvečano sintezo lipidov v tumorjih, kar je značilno za raka na dojki (26).

1.3 SPOT 14 (S14)

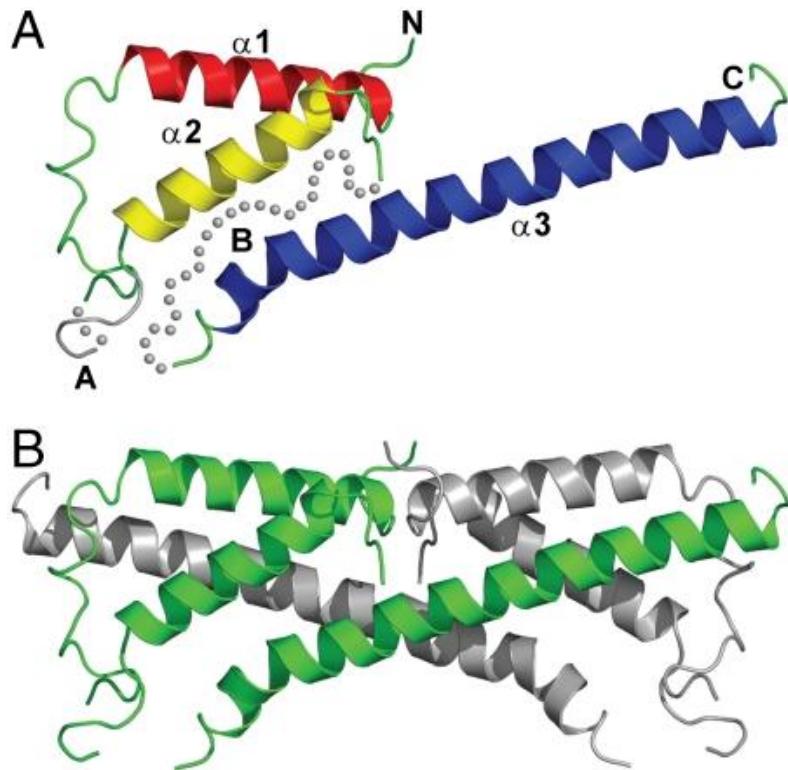
1.3.1 Kaj je SPOT 14 (S14)

THRSP (thyroid hormone responsive) gen, ki kodira protein, je poznan tudi kot S14, Lpgp (lipogenic protein 1), LPGP1, SPOT 14, MGC21659. Nahaja se na 11q14.1 kromosomskega lokusa (28) (Slika 2). Velik je 146 AK oziroma 16561 Da in igra pomembno vlogo pri urejanju lipogeneze. Pomemben je za biosintezo trigliceridov s srednje dolgo verigo maščobnih kislin. Lipogenezo lahko regulira z vzajemnim delovanjem z *MID1/P1* (gen, ki sodeluje pri oblikovanju mikrotubulov) in preprečuje njihovo interakcijo z *ACACA* (gen za acetilCoA karboksilazo alfa). Lahko deluje kot transkripcijski koaktivator in lahko modelira transkripcijski faktor THRB (receptor beta za T3) (29).



Slika 2: Položaj gena S14 na kromosomu 11. (29)

Protein S14 ima molekulsko maso 18.000 in izoelektrično točko pri 4,9 (30). Trodimenzionalna struktura proteina S14 je bila določena z rentgensko kristalografijo. Glavni del monomera S14 je sestavljen iz treh antiparalel alfa heliksa (Slika 3A). Heliks 1 in 2 merita v dolžino 30Å, heliks 3 pa približno 60Å. Podaljšana dolžina heliksa 3 omogoča interakcije s sosednjimi monomerji. Tako je antiparalela heliksa 4 ustvarjena s povezavo C-terminalnega dela heliksa 3 z glavnim delom drugega monomera v homodimer (Slika 3B). Dimer S14 je velik približno 25x30x75Å z monomeri povezanimi v dvakratno simetrijo (31).



Slika 3: Kristalna struktura monomera S14 (A) in homodimera (B). (31)

1.3.2 Izražanje in delovanje Spot 14

S14 je majhen jedrski protein, ki je bogat v lipogenih tkivih (jetra, belo in rjavo maščevje, mlečne žleze v laktacijski fazi). Tu je njegovo izražanje hitro regulirano s hormoni in prehranskimi sestavinami. S14 deluje na transkripcijski ravni transdukcijskih signalov za povečano izražanje genov, ki kodirajo lipogene encime. Kot to velja za mnoge transkripcijske faktorje, ima močno nagnjenost k homodimerizaciji. S14 je kisel transkripcijski faktor, ki deluje kot homodimer tako, da modulira izražanje gena kot sestavni del tritranskega kompleksa s 36 kDa velikim proteinom v jetrih.

Deluje v tkivno specifičnem nadzoru presnove, in sicer kot odgovor na spremenljajoče se prehranske in hormonske dejavnike. V jetrih se raven mRNA za *S14* hitro dvigne kot odgovor na fiziološke dražljaje, povezane s prehodom iz stradanja v hranjenje. Raven dvignejo prehranski ogljikovi hidrati, inzulin in ščitnični hormon trijodotironin T3. Nasprotno se izražanje *S14* zmanjša ob stradanju, pomanjkanju hormonov ščitnice, ob dodatku glukagona ali polinenasičenih maščob iz hrane. Taka tkivna specifičnost in hormonsko ter prehransko odvisna regulacija je tipična za lipogene encime. Vendar pa polipeptidno zaporedje S14 ni podobno kateremu od znanih encimov. Imunohistokemična analiza podganjih jeter je pokazala, da se S14 primarno nahaja v jedru, kar pa je v nasprotju z lokacijo sinteze maščobnih kislin, ki je v citoplazmi.

S14 lahko interagira z drugimi jedrskimi proteini, vendar lahko do te interakcije pride le s S14 homodimeri. Homodimer S14 *in vivo* lahko komunicira s p53 za nastanek tritranskega kompleksa v jedru, ki uravnava izražanje genov v lipogenih tkivih. V nasprotju z relativno šibko povezavo S14 homodimera s p53, pa je p53 močno povezan z relativno netopno jedrsko podkonstrukcijo, kot sta kromatin ali jedrski matriks (32).

1.3.3 Ščitnični hormon in glukoza uravnavata delovanje S14 proteina

3,5,3'-trijodotironin (T3) povzroči hitro povečanje translacije specifične mRNA (*mRNAS14*), ki kodira protein S14 (31). S14 protein se v jedrih hepatocitov, ki so izpostavljeni glukozi in ščitničnemu hormonu, pojavi zelo hitro. Izpostavljenost hepatocitov glukozi in T3, zdravljenih z *S14* protismiselnimi oligonukleotidi, zavre indukcijo mRNA, ki kodira ATP citrat liazo, FASN, piruvat kinazo jetrnega tipa,

fosfoenolpiruvat karboksilazo ter tip I deiodinazo. Ne zavre pa se indukcija hidroksimetilglutaril-CoA reduktaze, citokroma C in aktina mRNA. Zavre se indukcija S14, ne pa tudi propionat-CoA karboksilaze in mitohondrijske piruvat karboksilaze. S14 protein torej deluje na indukcijo mRNA, ki kodira ključne lipogene encime (ATP citrat liala, FASN), glikolitične encime (piruvat kinaza) in glukoneogene encime (fosfoenolpiruvat karboksilaza). Deluje tudi na s prehrano odziven tip I deiodinazo. Ne deluje pa na mRNA, ki kodira encime, ki sodelujejo pri mitohondrijskem celičnem dihanju (citokrom C) ali pri sintezi holesterola (hidroksimetilglutaril-CoA). Ti učinki so posredovani na transkripcijski ravni. Protein sodeluje pri aktiviranju genov v jetrih, ki sodelujejo pri presnovnem preklapljanju med obdobji stradanja in hranjenja.

Jetra, maščevje in mlečne žleze v laktaciji sintetizirajo maščobne kisline, ki jih porabijo kot energetski vir. V teh tkivih je lipogeneza urejena glede na razpoložljivost prehranskih substratov in krožečih hormonov, ki nadzirajo presnovo. Glavni mehanizem, na podlagi katerega se pojavi odziv, je regulacija izražanja genov, ki kodirajo lipogene encime. S tako tkivno specifično kontollo je bil povezan S14. S14 mRNA je bogata le v lipogenih tkivih in njen izražanje se hitro spreminja v odvisnosti od dražljajev, ki modulirajo regulacijo maščobnih kislin, vključno s prehranskimi ogljikovimi hidrati in polinenasičenimi maščobami ter ravnijo ščitničnega hormona in glukagona.

Večplastna ureditev in jedrska lokalizacija S14 proteina predlagata funkcijo za nadzor lipogeneze. Indukcija sinteze lipidov z glukozo in trijodotirononom (T3) se zavre v celicah, ki so bile obdelane s S14 protismiselnimi oligonukleotidi. To naj bi bila posledica zmanjšane akumulacije lipogenih encimov, vključno s FASN in ATP citrat lialo (33).

1.3.4 CLA (konjugirana linolna kislina) zavira izražanje S14 in FASN genov pri raku dojke in liposarkomu

S14 sodeluje pri uravnavanju genov, potrebnih za sintezo maščobnih kislin v malignih in normalnih mlečnih epitelnih in adipoznih celicah. CLA zavira izražanje S14 genov v mlečni žlezi pri govedu in adipoznem tkivu pri miših ter zmanjša proizvodnjo mlečne maščobe pri kravah. Iz tega so postavili hipotezo, da CLA zavira izražanje S14 genov pri raku dojke in liposarkomu pri ljudeh in da bo zavirala njihovo rast. Izpostavljenost rakavih celic dojke mešanici izoencimov zmanjša izražanje S14 in FASN

genov. Mešanica povzroči od odmerka odvisno inhibicijo rasti celic. Dodatek in zagotavljanje palmitata pa v celoti ali samo delno obrne antiproliferativni učinek v celicah. CLA prav tako zmanjša nivo *S14* in *FASN* mRNA v liposarkomskih celicah in povzroči zastoj rasti. Ta učinek se prepreči s palmitinsko kislino. CLA ni vplivala na rast nelipogenih celic ali človeških fibroblastov.

Za CLA je znano, da inhibira rast celic dojke v tkivni kulturi in tumorjev pri nekaterih modelih raka dojke pri glodalcih. CLA zavira angiogenezo in žilno endoteljski rastni dejavnik pri mišjem modelu, kar nakazuje, da lahko ti učinki prispevajo k njenem protitumorskem delovanju (34).

1.3.5 Izražanje proteina S14 v jetrih je regulirano s CAR

PXR in CAR sta bila prvotno izolirana kot jedrska receptorja, ki regulirata ksenobiotično presnovo in izločanje (35).

CAR (konstitutivni androstan receptor) je protein, ki ga pri ljudeh kodira gen *NRI/3*. Je jedrski receptor in skupaj s PXR (pregnan X receptor; protein, ki ga kodira gen *NRI/2*) (36), regulira presnovo in izločanje endobiotičnih in ksenobiotičnih snovi in je zato pomemben pri razstrupljanju (37).

Nedavne raziskave pa navajajo, da ti ksenoreceptorji sodelujejo v jetri presnovi lipidov. Aktivatorji receptorja CAR (na primer fenobarbital,...) inducirajo izražanje gena *S14*.

Ugotovljeno je bilo, da CAR ureja serumske vrednosti trigliceridov, medtem ko PXR povečuje shranjevanje le-teh pri miših. PXR izboljšuje jetrno *de novo* lipogenezo prek up-regulacije proteina S14. Gen *S14* se uporablja kot model za ureditev *de novo* lipogeneze, ker se vsebnost S14 v tkivih spreminja neposredno s sposobnostjo tkiv za sintezo lipidov. Natančneje, raven *S14* mRNA v belem in rjavem maščobnem tkivu ter v jetrih se poviša, ko se aktivira *de novo* sinteza maščobnih kislin s prehrano ali hormonskimi dražljaji. Poleg tega je več poskusov pokazalo, da je indukcija *S14* potrebna za indukcijo lipogeneze s T3 in prehranskimi ogljikovimi hidrati v jetrih. Na primer, THRSP-null miške pokažejo zmanjšanje lipogeneze v mlečni žlezi, kar vodi do zmanjšanja skupne rasti mladičev v primerjavi z mladiči, ki so sesali. Dejansko THRSP-null miške pokažejo pomanjkljivosti pri *de novo* lipogenezi v mlečni žlezi in povečano občutljivost na

inzulin. Vendar pa se stopnja jetrne *de novo* lipogeneze poveča, če so te miške izpostavljene dolgotrajnemu zdravljenju s ščitničnim hormonom T3 ali se prehranjujejo z ogljikovimi hidrati. To pokaže, da lahko alternativne poti pokrijejo pomanjkanje THRSP.

Ker je za S14 znano, da je reguliran s ščitničnim hormonom T3, PXR in CAR, so njihov induktivni učinek primerjali v človeških hepatocitih. Aktiviranje T3, CAR in PXR je povzročilo precej podoben učinek na kopičenje *S14* mRNA. Poleg tega so ugotovili, da 48-urno zdravljenje s CAR ali PXR agonisti povzroči povečano izražanje genov *FASN* in *ATP citrat liaze* v človeških hepatocitih. Nasprotno pa je bil učinek fenobarbitala na izražanje lipogenih genov manj izrazit.

V jetrih mišk je CAR potreben za indukcijo THRSP, posredovano z zdravili. Da bi to potrdili *in vivo*, so vzgojili divji tip mišk CAR-null in PXR-null. Zdravili so jih z CAR aktivatorji, fenobarbitalom in PXR aktivatorji. Te spojine so bistveno povečale izražanje *S14* mRNA, odvisno od prisotnosti ksenosenzorjev, ki dokazujejo, da so CAR in PXR potrebni za te učinke (35).

1.3.6 Vloga večkrat nenasičenih maščobnih kislin (PUFA) v jetrni lipogenezi preko SREBP1c

Večkrat nenasičene maščobne kisline (PUFA) zavirajo jetrno prepisovanje genov lipogeneze prek PPAR α (peroksisomski rastni aktivatorski receptor alfa) in prek ciklooksigenazno neodvisnega mehanizma. Odziv SREBP1 (sterol response element-binding protein) je bil vpleten v prehransko kontrolu lipogeničnega genskega izražanja.

PUFA zniža tako jetrno mRNA *SREBP1* prek PPAR α -neodvisnega mehanizma, kot tudi SREBP1c jedrno vsebino (nSREBP1c). Ko-transfekcija v primarnih hepatocitih je pokazala različno občutljivost FASN, S14 in LPK (L-piruvat kinaza) na promotorje, ki so povzročili čezmerno izražanje nSREBP1c. LPK je najmanj občutljiva na čezmerno ekspresijo nSREBP1c. Analize z delecijo ali genskim premikom S14 promotorja so lokalizirale funkcionalni SREBP1c cis-regulatorni element v S14 odgovarjajoči regiji PUFA. Čezmerno izražanje nSREBP1c je bistveno zmanjšalo S14CAT (CAT = kloramfenikol acetil transferaza) zaviranje PUFA. Rezultati kažejo, da PUFA ureja jetrno nSREBP1c, dejavnik, ki funkcionalno komunicira z odzivom *S14* regije PUFA. PUFA

regulacija nSREBP1c je lahko odvisna od PUFA-posredovanega zaviranja transkripcije *S14* genov.

Torej so večkrat nenasilčene maščobne kisline (PUFA) močni zaviralcji jetrne lipogeneze *de novo* (38).

1.3.7 Gen *S14* pri raku dojke

Povečana sinteza dolgoverižnih maščobnih kislin se lahko pojavi pri več skupinah neoplazme, vključno s tistimi, ki izhajajo iz dojke, prostate, jajčnikov, debelega črevesa in endometrija. Izkazalo se je, da napovedujejo slabo prognozo.

Poleg svoje fiziološke vloge pri presnovnih procesih je *S14* sestavni del virulentnih lipogeničnih fenotipov opaženih pri raku dojke. Lipogenični tumorji dojke čezmerno izražajo *S14* in lipogenične encime. *S14* razklop pri raku dojke pa povzroči zmanjšano lipogenezo in poveča apoptozo. Človeški primarni tumorji dojke z visokim izražanjem *S14* se bodo veliko verjetneje ponovili (34).

Kot že rečeno, se pri raku dojke lahko pojavi okrepljena sinteza dolgoverižnih maščobnih kislin, ki je potrebna za rast tumorjev, napoveduje pa slabo prognozo. *S14* gen uvrščamo med markerje D11S906 in D11S937, na telomernem koncu regije na 11q13. Skladno izražanje *S14* in ključnega lipogenega encima (acetil-CoA karboksilaza) v primarnih vzorcih raka dojke močno podpira vlogo *S14* kot determinante lipidnega metabolizma pri tumorjih. Izražanje *S14* zagotavlja patofiziološko povezavo med dvema prognostičnima kazalcema pri raku dojke: izboljšano lipogenezo in 11q13 ojačanje.

Vloga *S14* v tkivno specifični transdukciji hormonsko in s prehrano povzročenih signalov za aktivacijo genov, ki sodelujejo v lipogenezi, postavlja hipotezo, da je nepričakovano izražanje *S14* pomembno v pogojih z nenormalno presnovo lipidov. Eden takih pogojev je rak dojke. Tudi čezmerno izražanje *FASN*, glavnega encima biosinteze maščobnih kislin, je pokazatelj za slabo prognozo pri tumorjih raka dojke. *FASN* je pomemben tudi za metabolizem tumorja in njegovo rast. Farmakološko zaviranje sinteze maščobnih kislin v celicah raka dojke s čezmernim izražanjem *FASN* povzroči zmanjšano rast in programiranje celične smrti. Ta učinek se izniči, če v medij za rast dodamo

palmitinsko kislino. Večje izražanje *FASN* se pojavlja tudi pri primarnih tumorjih dojke. Mehanizem povečanega izražanja lipogenih encimov v tumorjih ni znan.

Kot smo že povedali, se gen *S14* nahaja na dolgi ročici enajstega kromosoma (11q13). Ta amplikon se pojavlja v približno 20 % raka dojke in to ojačanje napoveduje slabo prognozo. Menijo, da 11q13 amplikon vodi v prekomerno izražanje genov, ki so ključnega pomena za rast tumorjev. Zato predvidevamo, da je *S14* gen dopolnjen in prekomerno izražen pri raku dojke, kar lahko vodi do povečane tumorske lipogeneze. Ciklin D1 (*CCD1*) in *EMSI* sta gena, za katera je znano, da se prekomerno izražata pri raku dojke z 11q13 ojačanjem. Ciklin D1 je jedrni protein, ki ureja prehod v G1 fazo celičnega cikla in je nesporen kandidat za onkogen. Transgene miške s konstitutivno prekomernim izražanjem *CCDN1* razvijejo neoplazijo mlečne žleze. *EMSI* kodira substrat, ki je povezan z vezavo tumorskih celic na zunajcelično podlago. Ta protein bi lahko posredoval interakcijo z zunajceličnim matriksom, kar bi bilo pomembno za metastaze. Nekaj značilnosti amplikona 11q13 predлага, da morajo biti drugi geni, ki so pomembni za rast tumorja, izraženi iz njega. Na primer, amplikon je dokaj velik (do 5MBP) in ojačanje na njem je nezvezno.

S14 tako zagotavlja kritično presnovno povezavo med prognostičnima kazalcema pri raku dojke: 11q13 ojačanje in povečana sinteza maščobnih kislin.

Malo je znanega o urejanju *S14* izražanja v tkivu dojke, razen tega da se sproži med lipogenimi zahtevami dojenja pri podganah in tudi pri človeku. V celičnih linijah, pridobljenih iz raka dojk, ki čezmerno izražajo *FASN*, je encim inducirani iz progestina, kar kaže na nedotaknjen regulatorni mehanizem. Prihodnost bo pokazala, ali to zahteva indukcijo *S14*, podobno njegovi funkciji v transdukciiji s ščitničnim hormonom povzročenih signalov za lipogenezo v jetrih. Če je tako, bi lahko hormonska ali druga sredstva za manipulacijo izražanja *S14* vplivala na presnovo in rast tumorjev, izbranih na način, podoben kot farmakološka inhibicija lipogeneze (39).

1.3.8 Izražanje *S14* v hepatocitih

S14 se izraža tudi v hepatocitih, čeprav na nižji ravni kot v steatoznih (maščobno degeneriranih) jetrih, v katerih je presnova maščob nenormalna. Podobno je bila visoka stopnja *S14* mRNA dokazana v nodulih pacientov, ki trpijo za boleznijo Launois-Bensaude

(je redka bolezen, za katero je značilna simetrična maščobna obloga v glavnem na vratu in lahko privede do večje funkcionalne in estetske škode (40)). To bi lahko bilo povezano z odpornostjo na kateholamine, opisano pri tej bolezni in na dejstvo, da cAMP močno zmanjša izražanje S14, vsaj pri tkivih glodavcev (41).

Čeprav ostaja natančna fiziološka vloga S14 neznana in zahteva nadaljnje raziskave, je jasno vpletен kot regulator lipogeničnega procesa. Dejansko se S14 zdi nujen za podporo večji *de novo* lipogenezi v jetrih in večjem izražanju lipogeničnih encimov pri živalih z visoko vsebnostjo ogljikovih hidratov v hrani ali po zdravljenju s ščitničnim hormonom (35).

2 NAMEN DELA

Namen raziskave diplomskega dela je ugotoviti stopnjo izražanja gena za protein Spot 14 (S14) v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu in izražanje v sosednjem, navidezno zdravem, pljučnem tkivu pri istem bolniku. Protein S14 namreč uravnava izražanje encimov za sintezo višjih maščobnih kislin in tako zagotavlja zvečano sintezo lipidov v tumorju. Po nekaterih študijah S14 posreduje indukcijo lipogeneze v rakavih celicah in pospešuje njihovo rast. Nasprotno pa razklop S14 oslabi *de novo* sintezo lipidov in povzroči apoptozo. Poleg tega nas zanima, ali izražanje gena *S14* korelira s stadijem bolezni in stopnjo preživetja v obdobju štirih let po operaciji ter ostalimi kliničnimi podatki bolnikov, kot sta histološki tip tumorja in izguba telesne teže bolnikov pred operacijo.

Dokazati želimo naslednje hipoteze:

1. izražanje gena za protein S14 je višje v tumorskem tkivu kot v sosednjem, navidezno zdravem pljučnem tkivu istega bolnika,
2. izražanje *S14* je povezano vsaj s katerim od opazovanih kliničnih znakov.

Kot metodo za preučevanje merjenja izražanja gena za *S14* bomo uporabili verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR). Merili bomo izražanje gena v tumorskem in kontrolnem tkivu 41 bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom. Rezultate teh meritev bomo statistično ovrednotili in poskušali z njihovo pomočjo potrditi oziroma ovreči postavljeni hipotezi.

S14 v pljučnem raku še ni bil preučen. Glede na raziskave pri drugih rakih pa pričakujemo, da bomo hipotezi potrdili. Višje izražanje gena *S14* namreč potencialno pomeni boljšo preskrbo rakavega tkiva z višjimi maščobnimi kislinami in možnost lažjega metastaziranja v okoliška tkiva. Pričakujemo tudi potrditev povezave med izražanjem gena in opazovanimi kliničnimi znaki pri bolnikih. Z višjim izražanjem gena torej pričakujemo hitrejše napredovanje rasti tumorskega tkiva, nižjo stopnjo 4-letnega preživetja in agresivnejši histološki tip tumorja.

Potrjeni hipotezi bi bili dobra osnova za nadaljevanje raziskav na celičnem nivoju. *S14* bi lahko proučevali kot potencialno tarčo za zdravljenje bolezni. *S14* bi lahko uporabili kot marker za merjenje agresivnosti raka ter morebitno tarčo za antagoniste, ki bi zavirali izražanje gena *S14*. To bi nam omogočilo zelo usmerjeno zdravljenje ali upočasnitev napredovanja bolezni.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZBIRA BOLNIKOV IN VZORCI

V preiskavi je sodelovalo 42 bolnikov, ki so prestali operativno odstranitev nedrobnoceličnega pljučnega raka v stadiju I, II, III. Vključitveni kriterij je bil tumor pljuč brez metastaz, ki se ni vraščal v okoliško tkivo. Vsakemu bolniku so odvzeli dva tkivna vzorce, in sicer prvega iz periferije tumorja, kjer je območje največje rasti, in drugega iz sosednjega, navidezno zdravega tkiva. Mesto odvzema nerakavega pljučnega tkiva je bilo od tumorja oddaljeno vsaj 10 cm, tkivo pa je bilo organoleptično neprizadeto. Tkvne vzorce so odvzeli najkasneje v 15 minutah po resekciji pljuč. Vzorce tkiv so do analize shranili najprej v tekočem dušiku, izolirane mRNA in prepisane v cDNA pa v zamrzovalniku na -80 °C. Histološke analize tumorskih tkiv vzorcev so izvedli po histološki klasifikaciji WHO. Stadiji so bili določeni po TNM klasifikaciji (42). Študijo je odobrila nacionalna etična komisija, dovoljenje so dobili tudi od vseh bolnikov, vključenih v raziskavo.

Bolnike so opazovali štiri leta. Prvi dve leti so jih pregledovali vsake tri mesece, naslednji dve leti pa vsakih šest mesecev. Klinični status in rezultati rentgenskega slikanja so bili analizirani pri vsakem pregledu. V primeru suma na napredovanje bolezni so opravili bronhoskopijo in računalniško tomografijo. Bolniki v stadiju III so bili postoperativno zdravljeni tudi s kemoterapijo.

Izražanje gena za protein S14 smo analizirali pri vseh 42 bolnikih, to je v 84 vzorcih cDNA izoliranih iz kontrolnih pljučnih tkiv in iz tumorskih tkiv pljučnega raka.

3.2 MATERIALI IN APARATURE

- Droben laboratorijski material:
 - pinceta,
 - eppendorf avtomatske pipete: 0.5-10 µl, 2-20 µl, 100-1000 µl,
 - nastavki za pipete,
 - Eppendorf mikropruvete: 0.2, 0.5, 1.5 in 2 ml,

- stojalo za mikripruvete,
 - prozorna samolepilna folija,
 - ploščica za PCR v realnem času s 96 vdolbinicami (Applied Biosystems).
- Aparature:
 - avtoklav,
 - brezprašna PCR komora,
 - vrtinčno mešalo (BIOSAN),
 - centrifugirka (CENTRIC 322A),
 - hladilnik (+2 do +8 °C),
 - zamrzovalnik (-80 °C),
 - aparat za PCR v realnem času ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems).

3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (PCR)

Reakcija verižne polimerizacije (PCR) je metoda za hitro pomnoževanje DNA *in vitro*. Razvoj te metode je pomagal pri rešitvi mnogih problemov, ki so se prej zdeli nerešljivi. Možnosti za uporabo te metode so ogromne, saj PCR med drugim omogoča direktno kloniranje genomske DNA ali cDNA, usmerjeno mutagenezo DNA, analizo DNA, ki je dostopna v majhnih količinah, različne diagnostične metode itd. (43).

3.3.1 Optimizacija pogojev PCR

- Pogoji kroga reakcije

Pri tej metodi gre za časovno hitro pomnoževanje fragmentov DNA med dvema začetnima oligonukleotidoma s termostabilno polimerazo ob spremjanju temperatur. Iz enega fragmenta DNA, ki služi za matrico, dobimo veliko število njegovih kopij. Pomnoževanje poteka v ciklih (30-40). Ponavlja se tri stopnje: denaturacija (1 minuta, 94 °C), prileganje (45 sekund, 54 °C) in podaljševanje (1-2 minuti, 72 °C). Na začetku reakcije, na stopnji denaturacije, se dvojna vijačnica denaturira. Nato se temperatura zniža,

da se lahko na razklenjeno DNA vežeta dva začetna oligonukleotida, komplementarna delom zaporedja, kjer hočemo začeti pomnoževanje. Sledi stopnja, ko se temperatura dvigne do temperature optimuma za delovanje termostabilne DNA polimeraze. Takrat začne DNA polimeraza dodajati nove nukleotide in nastajajo novi fragmenti DNA. Nato se temperatura ponovno zviša in postopek se tako ponavlja, dokler ne dobimo želene količine pomnožene DNA (43).

- Izbira začetnih oligonukleotidov

Izbira začetnih oligonukleotidov je najpomembnejši parameter uspešnosti metode PCR v realnem času. Pri oblikovanju začetnih oligonukleotidov je priporočljivo:

- da je dolžina pomnoženega odseka DNA od 80 do 250 baznih parov, saj se daljši odseki ne pomnožujejo učinkovito,
- da so začetni oligonukleotidi dolgi od 18 do 24 baznih parov, kar je pomembno za primerno temperaturo prileganja,
- da so začetni oligonukleotidi specifični za tarčno zaporedje in ne vsebujejo notranjih sekundarnih struktur,
- da ima par začetnih oligonukleotidov podobno temperaturo taljenja (dovoljena odstopanja so približno 50 °C) in vsebnost GC približno 50 % (43, 44).

- Sestava reakcijskega pufra

Reakcijski pufer mora imeti optimalno vrednost pH in ionsko jakost za izbrani encim. Kritična je optimizacija koncentracije Mg²⁺ v reakcijski zmesi. Koncentracija Mg²⁺ lahko vpliva na vezavo začetnih oligonukleotidov, na temperaturo denaturacije dvostranskih molekul DNA, na specifičnost produktov, na nastanek oligonukleotidnih dimerov ter na encimsko aktivnost in natančnost. Običajno je optimalna koncentracija ionov Mg²⁺ za 0,5-2 mM večja od skupne koncentracije vseh dNTP-jev.

Pri dodanih dNTP-jih mora biti koncentracija vseh štirih v reakcijski zmesi enaka. S tem se zmanjša verjetnost vgrajevanja napačnih nukleotidov v produkt PCR. Verjetnost napačnega vgrajevanja se poveča tudi, če je koncentracija dNTP-jev previsoka. Optimalno

koncentracijsko območje je med 20 in 200 µM posameznega dNTP-ja. V večini primerov je 20 µM posameznega dNTP-ja dovolj, saj zadošča za sintezo 2,6 µg DNA.

Pufer vsebuje tudi različne kemikalije, ki povečajo učinkovitost in specifičnost PCR. Neionski detergenti (Triton X-100, Tween 20, Nonidet P-40) nevtralizirajo naboje ionskih detergentov, ki se uporabljajo v postopkih izolacije DNA in pridejo v reakcijsko zmes kot nečistota v vzorcu DNA. Večja učinkovitost reakcije se doseže z reagenti, ki stabilizirajo encim, na primer s proteinom albuminom in želatino ali z glicerolom. Če se DNA pomnožuje z visokim odstotkom baznih parov GC, je lahko problematična stopnja denaturacije. V takih primerih se doda formamid, ki zniža Tm (temperatura taljenja), ali pa protein betain (43).

- Izbira tipa DNA-polimeraz

Taq DNA-polimeraza se najdlje uporablja v metodah molekularne biologije. Polimeraza nima 3'-eksonukleazne aktivnosti in zato je verjetnost napačno vgrajenega nukleotidnega zaporedja precej velika. Dodaten problem predstavlja še lastnost *Taq* polimeraze, da na 3'-koncu produkta doda nukleotid, običajno A, po koncu matrične DNA. Ostale polimeraze (na primer *Pfu*, *Psp*, *Tbr*, *Tfl*) so sposobne sinteze daljših produktov, druge vgrajujo nukleotide z manjšo pogostostjo napak, nekatere sintetizirajo samo tope konce DNA, nekatere pa združujejo več opisanih lastnosti. V splošnem pa so vsi encimi manj učinkoviti od *Taq* DNA-polimeraze (43).

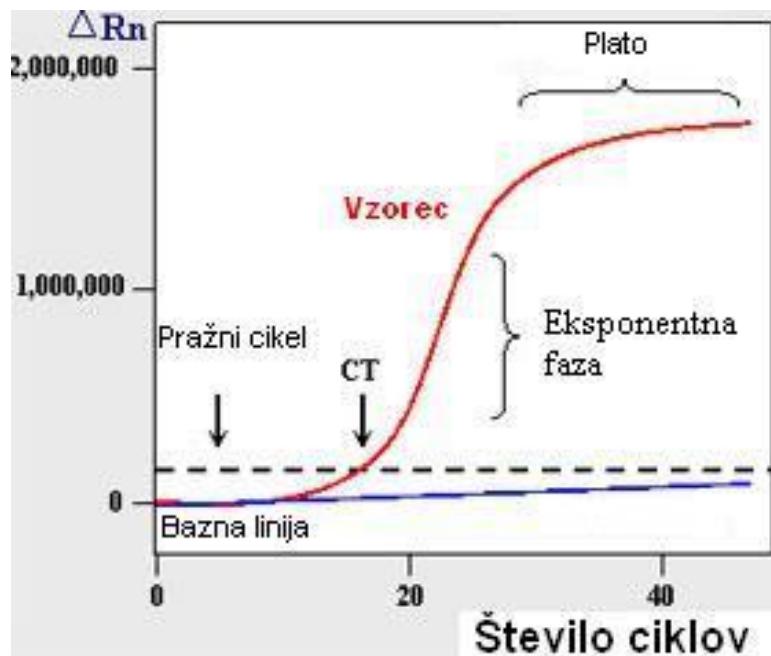
3.3.2 Princip metode

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času predstavlja nadgradnjo konvencionalnega PCR. Sinonim zanj je kinetični ali kvantitativni PCR (qPCR), ki omogoča določevanje relativnih količin neke določene mRNA v določenem vzorcu. Število molekul v osnovnem vzorcu se določi glede na to, v katerem krogu reakcije je produkte možno zaznati. V reakcijsko zmes je dodana tudi notranja kontrola, to je DNA znane količine s parom ustreznih začetnih oligonukleotidov (43).

Med potekom reakcije merimo fluorescenco reakcijske zmesi. Če izrišemo krivuljo odvisnosti fluorescence od števila ciklov reakcije, dobimo graf pomnoževanja, ki prikazuje

kopičenje produkta v času (44). Na grafu so vidne tri stopnje reakcije: bazna linija, eksponentna faza in plato (Slika 4). Med fazo bazne linije je fluorescenza produkta nižja od signala ozadja in traja približno 3 do 15 ciklov. Ko akumulacija produkta doseže kritični prag, je fluorescenza produkta večja od ozadja. Fluorescenza nato v eksponentni fazi ali logaritemsko-linearni fazì narašča linearo nekaj naslednjih ciklov. Iz te faze pridobimo podatke, ki so potrebni za izračun končnih rezultatov eksperimenta. Med zadnjo plato fazo fluorescenza doseže zgornjo najvišjo vrednost. Reaktantov začne primanjkovati in podvajanje ni več učinkovito. Količina produkta zato ni več proporcionalna začetni količini DNA. Ta faza ni več primerna za pridobivanje podatkov (45).

V analizah rezultatov, pridobljenih s PCR v realnem času, pozitivno reakcijo detektiramo s kopičenjem fluorescenčnega signala. Prag je količina signala, ki kaže na statistično značilno povečanje signala glede na signal bazne linije. Običajno ga instrumenti samodejno nastavijo na vrednost, ki je desetkrat večja od standardne deviacije vrednosti fluorescence v bazni liniji. Lahko pa je nastavljena ročno na poljubno vrednost. Pražni cikel (ang. threshold cycle, C_t) je cikel, pri katerem fluorescenza preseže nastavljeni prag. Vrednost C_t je obratno sorazmerna začetni količini DNA (44). To pomeni, da nižja kot je vrednost C_t , v vzorcu, več je nukleinske kisline. Pri 40-ih ciklih pomnoževanja vrednosti C_t , ki so manjše od 29, pomenijo močno pozitivno reakcijo z veliko prisotne tarčne nukleinske kisline, vrednosti med 30 in 37 pomenijo pozitivno reakcijo z zmerno količino tarčne nukleinske kisline, vrednosti med 38 in 40 pa pomenijo šibko reakcijo, ki lahko nakazuje zelo nizko količino tarčne nukleinske kisline ali celo kontaminiran vzorec.



Slika 4: Prikaz krivulje jakosti fluorescence v odvisnosti števila ciklov pri PCR v realnem času. (46)

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

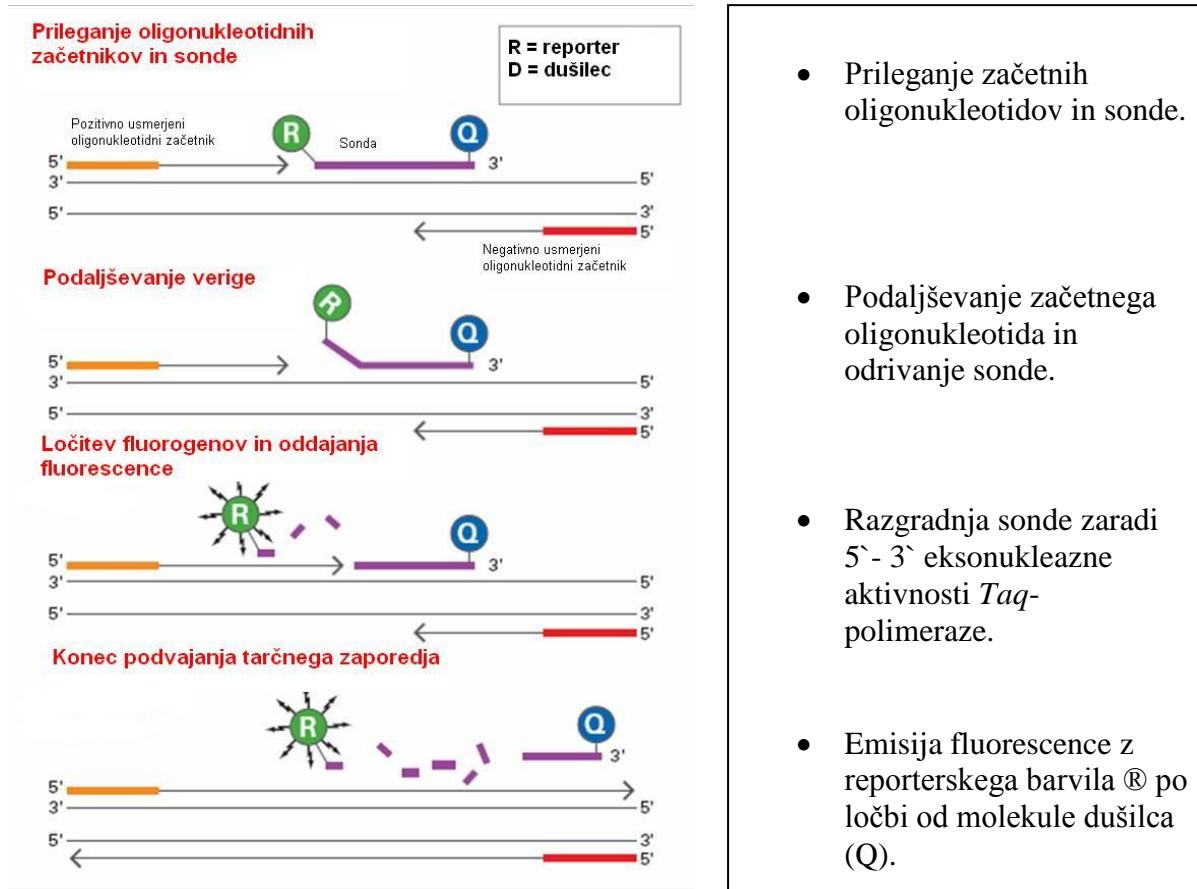
- Nespecifične metode zaznavanja pomnoženih odsekov

Sem sodijo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vežejo na dvostransko DNA, neodvisno od nukleotidnega zaporedja produkta. Absorbirajo svetlobo nižje valovne dolžine in oddajajo svetlobo višje valovne dolžine. Njihova fluorescensa se močno poveča pri vezavi na dvostransko DNA (dsDNA). Intenziteta signala je odvisna od prisotne količine dsDNA in sicer več kot je dsDNA, večja je fluorescensa (44). Na začetku se je uporabljal etidijev bromid, vendar ga je kmalu zamenjalo barvilo SYBR Green I, ker ima večjo intenziteto do dvostranske DNA. Barvila, ki se tudi uporabljajo, so BEBO, YOYO-1, TOTO-1 (47).

- Specifične metode zaznavanja pomnoženih produktov

Pri specifičnih načinih detekcije uporabljamo s fluorofori označene oligonukleotide. Ti se specifično vežejo na odsek DNA, ki ga pomnožujemo. Za meritev signala izkoriščamo princip FRET tehnologije – Förster resonance energy transfer ali Fluorescence resonance energy transfer – princip fluorescentnega resonančnega prenosa energije iz donorske na akceptorsko molekulo. V ta namen uporabljamo dva fluorofora, katerih eksitacijski in emisijski spekter se prekrivata. Ko sta fluorofora dovolj blizu, vzburenje donorskega barvila povzroči sevanje svetlobe. Ta vzburi akceptorsko barvilo, ki posledično seva svetlobo drugačne valovne dolžine. Kot sprejemnike lahko uporabljamo tudi molekule, ki absorbirajo svetlobo donorske molekule, same pa ne fluorescirajo (48). Najpogosteje se uporablja hidrolizirajoče in hibridizacijske sonde ter molekularna svetila.

Pri **hidrolizirajočih sondah** izkoriščamo 5'-eksonukleazno aktivnost DNA-polimeraz. Najpogosteje se uporablja *Taq* DNA-polimeraza. V reakcijsko zmes dodamo sondu, ki se specifično veže na tarčno zaporedje na DNA in dva neoznačena primerja na obeh koncih sonda. Sonda ima na obeh koncih vezana različna fluorofora. Na 5' koncu je vezano donorsko barvilo (reporter), ki seva fluoresenco. Na 3' koncu pa je vezano akceptorsko barvilo (dušilec), ki to fluoresenco prestreže. 5'-eksonukleazna aktivnost *Taq* DNA-polimeraze povzroči v stopnji podaljševanja hidrolizo sonda. Razdalja med reporterskim barvilm in dušilcem se poveča in onemogoči prestrezanje fluorescence. Fluoresanca reporterskega barvila zato poraste in je sorazmerna s količino produkta PCR (Slika 5). Na tej metodi temelji TaqMan analiza (Applied Biosystems) (48, 49).



- Prileganje začetnih oligonukleotidov in sonde.
- Podaljševanje začetnega oligonukleotida in odrivanje sonde.
- Razgradnja sonde zaradi 5'-3' eksonukleazne aktivnosti *Taq*-polimeraze.
- Emisija fluorescence z reporterskega barvila ® po ločbi od molekule dušilca (Q).

Slika 5: Princip delovanja PCR v realnem času s sondom TaqMan. (50)

Hibridizacijske sonde vključujejo dve sekvenčno specifični sondi. Prva je označena z donorskim, druga pa z akceptorskim fluoroforom. V stopnji prileganja se zaporedno vežeta na odsek, ki ga pomnožujemo. Vzburjenje donorskoga fluorofora na 3' koncu prve sonde povzroči prenos energije na akceptorski fluorofor na 5' koncu druge sonde. Ta seva svetloba z daljšo valovno dolžino. Izmerjena svetloba je sorazmerna s količino nastalega produkta PCR. Ker nastane signal samo ob vezavi obeh sond na homologni in zaporedni tarčni zaporedji, so te sonde zelo specifične (48).

Molekularna svetila so hibridizacijske sonde, ki tvorijo stebelno zanko zaradi komplementarnih zaporedij na 5' in 3' koncih. Sonda ima na enem koncu vezan reporterski fluorofor, na drugem pa nefluorescentni dušilec. Kadar je sonda v obliki zanke, dušilec prestreže fluoresenco reporterskega barvila. V stopnji prileganja se sonda veže na odsek, ki ga pomnožujemo. Stebelna zanka se razpre in razdalja med reporterskim barvilom in

dušilcem se poveča. Fluorescensa reporterskega barvila poraste in je sorazmerna s količino nastalega produkta PCR. V stopnji podaljševanja se sonda odlepi od tarčnega zaporedja in ponovno oblikuje stebelno zanko (48).

V diplomski nalogi smo PCR v realnem času uporabili kot metodo merjenja izražanja gena *S14*.

3.3.3 Potek reakcije PCR v realnem času

Za PCR v realnem času smo uporabili TaqMan kemijsko metodo. Kot matrico smo uporabili cDNA vzorce bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom.

Postopek:

1. Priprava MasterMix-a:

V brezprašni komori smo najprej pripravili reakcijsko raztopino (MasterMix), pri čemer smo uporabili:

- FastStart Universal probe Master (ROX, Roche; ref: 04913949001), to je raztopina pufra, elektrolita in encima,
- TaqMan®Gene Expression Assay (Hs00930058_m1, Applied Biosystems) – (oligonukleotidni začetniki in sonda za *S14*),
- dvakrat destilirana voda (ddH₂O).

Količine posameznih komponent, ki so potrebne za eno reakcijo, so podane v Preglednici IV.

Preglednica IV: Volumni sestavin za reakcijsko raztopino.

<i>Sestavine</i>	<i>Volumen (μl)</i>
FastStart Universal Probe Master	12,5
TaqMan®Gene Expression Assay	0,75
Dvakrat destilirana voda (ddH ₂ O)	10,75

Poleg reakcijske raztopine smo za reakcijo PCR v realnem času potrebovali še:

- raztopino cDNA tumorskega ali kontrolnega tkiva,
- raztopino cDNA internega standarda s stabilno koncentracijo,
- dvakrat destilirano vodo (ddH₂O).

Volumni so podani v Preglednici V.

Preglednica V: Volumni sestavin za končno raztopino, ki smo jo analizirali s PCR v realnem času.

<i>Sestavine</i>	<i>Volumni (μl)</i>
MasterMix	24
Raztopina cDNA vzorca tumorskega ali kontrolnega tkiva oz. cDNA inertnega standarda oz. ddH ₂ O	1

2. Priprava plošče:

Količino smo pomnožili glede na to, koliko reakcij smo izvedli.

Nato smo pripravili mikrotitrsko ploščico za PCR v realnem času s 96 vdolbinicami (Applied Biosystems). V vsako vdolbinico smo nanašali po 1 µl reagentov. V prvi dve vdolbinici smo nanesli dvakrat destilirano vodo (ddH₂O), ki je prestavljal negativno kontrolo. cDNA vzorce tumorjev in kontrolnega tkiva ter interni standard smo nanašali v treh ponovitvah, in sicer raztopino cDNA tumorskega tkiva, v naslednje tri vdolbinice cDNA kontrolnega tkiva istega bolnika, nato zopet tumorsko tkivo in kontrolno tkivo itd. V zadnjo vrsto ploščice pa smo nanesli interni standard s stabilno koncentracijo. Nato smo v vsako vdolbinico z reagentom dodali še 24 µl MasterMix-a. Tako je skupen volumen reakcijske zmesi v posamezni vdolbinici znašal 25 µl.

Na ta način smo pripravili vse potrebne mikrotitrskie ploščice, da smo zaobjeli vseh 42 bolnikov.

Mikrotitrskie ploščice smo prelepili s prozorno samolepilno folijo, njeno vsebino pretresli na vrtinčnem mešalu in dali v centrifugirko za 2 minuti na 1900 obratov. V primeru, da so bili prisotni zračni mehurčki, smo postopek s centrifugirko ponovili še enkrat. Ploščico smo nato vložili v ciklični termostat ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems), kjer je potekal PCR v realnem času.

3. Pomnoževanje:

Reakcija pomnoževanja se je začela z dvominutno inkubacijo pri 50 °C in nadaljevala z desetminutno začetno denaturacijo DNA pri 95 °C. Sledilo je 40 ciklov s temperaturnim profilom: denaturacija DNA 15 sekund pri 95 °C ter prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige 1 minuto pri 60 °C.

3.3.4 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 *S14* so 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. Iz štirih parov tkiv (tumorska in netumorska) so izolirali mRNA, jo prevedli v cDNA in v raztopini cDNA izmerili Ct cikle ter ocenili izražanje 11 genov. Izbor hišnega gena je temeljal na najmanjšem geometričnem povprečju Ct cikla posameznih kandidatnih genov z uporabo računalniškega programa geNorm (51). Poiskali so tisti hišni gen, ki se je najbolj enakomerno izražal v vseh tkivih vseh bolnikov, neodvisno od stanja bolezni oz. vrste tumorja. Hišni gen se namreč izraža vedno enako, ne glede na bolezen.

Predpostavko primerljive PCR učinkovitosti pri proučevanem in hišnem genu so predhodno preverili z dilucijsko krivuljno metodo. Pozitivni rezultati so dovoljevali uporabo primerjalne metode. S primerjalno metodo so primerjali vrednosti Ct *S14* v tumorskih in kontrolnih vzorcih z vrednostmi Ct *GUS* v istih vzorcih. Po spodnji enačbi so določili relativno izražanje *S14* glede na izražanje *GUS*.

$$RQ = 2 \exp (-\Delta\Delta Ct)$$

RQ.....relativna količina mRNA *S14* (glede na hišni gen in glede na najnižjo količino *S14* mRNA tarčnega gena v celotni raziskavi)

Ct.....pražni cikel

$$\Delta Ct_{vzorca} = Ct\ S14 - Ct\ GUS \text{ v istem vzorcu}$$

$$\Delta Ct_{min} = \text{najvišja vrednost } \Delta Ct \text{ v celotni raziskavi}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{min} - \Delta Ct_{vzorca}$$

Hišni gen se izraža enako v vseh vzorcih, ne glede na klinično stanje bolnika. S standardizacijo *S14* glede na hišni gen smo odpravili razlike med vzorci, ki so posledica razlik med izolacijo mRNA tkiva, uspešnosti izolacije, variabilnosti tkiva za izolacijo...

3.4 ZANESLJIVOST POSTOPKA IN PRIPOROČILA

Reagente za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času TaqMan® Gene Expression Assay in FASNtStart Universal Probe Master smo shranjevali v hladilniku, pri temperaturi +2 do +8 °C, kot je zanje predpisano. V mikropruveti je količina reagentov zadostna za več meritev. Ker smo poskuse opravljali pri sobni temperaturi, so se tudi reagenti krajsi čas nahajali na sobni temperaturi. Po končanem delu pa smo preostalo količino pospravili nazaj v hladilnik.

cDNA vzorce bolnikov za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času smo shranjevali v zamrzovalniku pri -80 °C. Ob vsakem poskusu so bili počasi odmrznjeni na sobni temperaturi. Po odvzemu potrebnih količin cDNA smo jih ponovno zamrznili. Z večkratnim odmrzovanjem in zamrzovanjem bi lahko povzročili spremembe v stabilnosti cDNA, a je bilo odtajanj malo in iz izkušenj manj od kritičnega števila odtajanj, ki bi lahko okrnilo stabilnost cDNA (pod 6-krat).

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

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

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

Interni standard je cDNA pljučnega tkiva naključno izbranega bolnika, ki se analizira v vsaki seriji meritev z namenom znižanja medserijske variabilnosti. Obdelali smo tudi meritve internega standarda. Pražno vrednost, ki jo je analizator določil avtomatično, smo povečali ali zmanjšali tako, da je bil Ct internega standarda v vseh meritvah enak. S tem smo zmanjšali medserijsko variabilnost meritev, ki je posledica različnega delovanja analizatorja, vpliva sistemskih napak...

3.5 STATISTIČNA ANALIZA

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. Primerjave več neodvisnih vzorcev, npr. primerjave glede na stadij bolezni in glede na histološki tip, smo naredili s Kruskal-Wallisevim testom. Primerjave dveh neodvisnih vzorcev, npr. glede na kajenje in izgubo telesne teže, pa smo naredili z Mann-Whitneyjevim testom. Povezave (korelacije) med parametri smo ocenili s Spearmanovo korelacijo rangov, za teste regresije pa smo uporabili Linearno regresijo. Coxovo regresijsko analizo smo uporabili za oceno prognostičnega pomena opazovanih parametrov. Statistično analizo smo izvedli s SPSS v.19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Pri vseh testih smo kot statistično pomembno opredelili vrednost $p < 0,05$ (5 % tveganje).

4 REZULTATI

4.1 KLINIČNI PODATKI O BOLNIKIH

Klinične podatke o bolnikih, ki so sodelovali v študiji, smo zbrali v Preglednici VI.

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

Parameter	Podatki
Število	41
Spol (ženske/moški)	11/30
Starost (leta)	61,41 {53,0/68,0} (44-77)
BMI (kg/m^2)	25,60 {22,15/28,35} (16,4-46,5)
Izguba teže v zadnjih treh mesecih (ne/da)	24/17
Kadilec (nikoli/trenutni ali bivši)	5/36
Stadij bolezni (I-III)*	17/14/10
Histološki tip tumorja (ploščatocelični/žlezni/velikocelični/drugi)	19/13/5/4

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

BMI – body mass index – indeks telesne mase

* Po TNM klasifikaciji (9)

Med 4-letnim spremeljanjem bolnikov je 1 bolnik umrl zaradi nerakavega razloga, zato smo ga izključili iz statistične obdelave. Klinične značilnosti preostalih 41 bolnikov so povzete v Preglednici VI. 21 bolnikov je med 4-letnim spremeljanjem umrlo zaradi napredovanja bolezni, ostali so po 4-ih letih še živi.

V raziskavi so sodelovali pretežno moški, teh je bilo 30 od skupaj 41 bolnikov. Žensk je bilo 11. Povprečna starost bolnikov je bila 61,41 let.

Indeks telesne mase (BMI) je razmerje med telesno maso v kilogramih in kvadratom telesne višine v metrih. BMI dobro ocenjuje delež telesne mašcobe, vendar ga ne smemo uporabljati kot natančen izračun. Obstajajo korelacije med BMI in deležem telesne mašcobe, ki so odvisne od spola in starosti. BMI se uporablja kot pokazatelj nepravilnega prehranjevanja in kot opozorilo za zdrav način življenja. Uporaben je tudi pri preučevanju vpliva telesne teže na zdravje in dejavnikov tveganja za razvoj bolezni, povezanih predvsem z debelostjo, kot so na primer slatkorna bolezen, srčno-žilne bolezni, itd. Povprečen BMI pri bolnikih je bil 25,60.

Težo je v zadnjih treh mesecih pred operacijo izgubilo 17 od 41 bolnikov, kar bi lahko povezali z napredovanjem bolezni.

36 obravnavanih bolnikov je trenutnih ali nekdanjih kadilcev, le 5 od 41 sodelujočih ni nikoli kadilo. To sovpada z dejstvom, da je kajenje glavni dejavnik tveganja za nastanek pljučnega raka.

Študija je vključevala bolnike v vseh treh stadijih bolezni (I, II in III). 17 sodelujočih je bilo v I. stadiju bolezni, 14 v II. Stadiju, 10 pa jih je imelo III. stadij. 46,3 % bolnikov je imelo ploščatocelični tip tumorja, 31,7 % žlezni tip, 12,2 % velikoceličnega, 9,8 % bolnikov pa je imelo drugi histološki tip raka.

4.2 REZULTATI MERITEV IZRAŽANJA SPOT 14 (S14)

Preglednica VII: Rezultati meritev mRNA tarčnega gena S14, hišnega gena GUS, normalizacija S14, glede na izražanje GUS, relativno izražanje S14 ter razmerje izražanja S14 v kontrolnem in tumorskem tkivu.

	Spot	14	GU	S	Normali Spot 14 na GUS	zacija glede		Spot 14 K	Spot 14 T	Spot 14T/K
vzorec	K	T	K	T	ΔCt_K	ΔCt_T	T/K	$2^{-\Delta Ct}$	$2^{-\Delta Ct}$	T/K
1	22,80	23,16	27,52	26,46	-4,72	-3,30	1,41	26,29	9,87	0,38
2	23,26	22,25	26,94	26,07	-3,68	-3,82	-0,14	12,85	14,16	1,10
3	21,33	22,26	25,69	23,94	-4,36	-1,68	2,68	20,49	3,20	0,16
4	21,40	23,17	26,26	24,85	-4,86	-1,68	3,18	29,11	3,20	0,11
6	21,89	23,04	25,46	26,03	-3,57	-2,99	0,58	11,88	7,93	0,67
8	21,18	23,10	25,59	25,62	-4,41	-2,52	1,89	21,26	5,74	0,27
9	21,50	22,52	25,76	25,45	-4,26	-2,93	1,32	19,12	7,64	0,40
10	22,95	21,28	25,95	25,13	-3,00	-3,85	-0,85	8,00	14,42	1,80
11	21,54	22,67	26,40	25,72	-4,86	-3,05	1,82	29,11	8,26	0,28
12	21,51	22,12	25,82	26,47	-4,31	-4,35	-0,04	19,79	20,39	1,03
13	22,03	22,96	26,38	26,17	-4,35	-3,21	1,14	20,39	9,25	0,45
14	22,18	23,51	25,85	26,57	-3,67	-3,06	0,62	12,76	8,32	0,65
16	22,00	23,25	25,56	26,29	-3,56	-3,04	0,52	11,77	8,21	0,70
17	21,68	21,97	26,54	26,88	-4,86	-4,91	-0,05	29,11	30,06	1,03
18	23,32	22,81	25,77	25,20	-2,45	-2,39	0,06	5,48	5,24	0,96
19	20,92	22,53	25,03	25,10	-4,11	-2,57	1,54	17,23	5,92	0,34
20	21,66	23,72	25,39	26,06	-3,73	-2,34	1,39	13,24	5,05	0,38
22	21,34	23,06	26,42	26,64	-5,08	-3,58	1,50	33,75	11,93	0,35
23	25,11	21,66	25,79	25,07	-0,68	-3,41	-2,73	1,60	10,65	6,65
25	21,31	22,07	27,31	26,29	-6,00	-4,22	1,78	64,00	18,59	0,29

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

K – kontrolno tkivo;

T – tumorsko tkivo;

GUS – β -glukuronidaza

T/K – razmerje tumorsko tkivo/kontrolno tkivo

4.2.1 Primerjava in povezava izraženosti gena *Spot 14* v tumorskem in zdravem tkivu

V raziskavah je bilo odkrito, da *S14* regulira biosintezne poti trigliceridov, metabolične procese lipidov in biosintezne procese lipidov. Bogato se nahaja v tkivih s sintezo maščobnih kislin, ki se uporabljajo kot energetski vir (mlečne žleze, maščevje, jetra). Študije, ki so preučevale izražanje *S14* v hepatocitih, podpirajo idejo, da *S14* signalizira izražanje gena, ki kodira encime za sintezo maščobnih kislin, ko prehransko in hormonsko okolje ni ugodno. Geni, ki kodirajo encime za sintezo maščobnih kislin, so zelo izraženi pri številnih oblikah raka, vključno z rakom dojke, prostate, debelega črevesa, jajčnikov in levkemije (52).

Študija, ki bi merila izražanje *S14* v pljučnem tkivu, še ni bila narejena. Prav tako še ni nihče izmeril izražanja gena v pljučnem rakavem in kontrolnem tkivu z namenom primerjanja.

Narejene so bile imunohistokemične analize izražanja *S14* pri raku dojke in ugotovili so, da je izražanje gena *S14* močno povečano v večini oblik raka dojke. Ugotovili so, da nivo izražanja gena za *S14* korelira z morfološkim tipom tumorja. Še pomembnejša pa je bila povezava visokega nivoja *S14* s krajšim preživetjem v invazivnih oblikah raka. Visoko izražanje *S14* napoveduje večjo verjetnost ponovitve bolezni. *S14* inducira lipogenezo v celicah raka dojke in pospešuje njihovo rast. Nasprotno pa razklop *S14* oslabi *de novo* sintezo lipidov in povzroči apoptozo. Celice raka na dojki ne izražajo lipoproteinske lipaze (LPL) in zato nimajo dostopa do višjih maščobnih kislin iz krvi, razen iz lokalnega okolja. To pojasni, zakaj primarni rak dojke z nizko koncentracijo *S14* ne preživi prehoda iz okolja bogatega z mlečnimi maščobami na področja brez njih, kot so na primer bezgavke, kar posledično onemogoča zasevanje v oddaljena tkiva. Tako je *S14* pokazatelj za agresivnost raka na dojki (52).

Zaradi teh študij smo pričakovali, da bo izražanje *S14* tudi v pljučnem rakavem tkivu višje kot v kontrolnem, navidezno zdravem tkivu.

Rezultati naše raziskave so v nasprotju s pričakovanji. Statistična analiza rezultatov je pokazala, da je bilo izražanje gena *S14* višje v kontrolnem tkivu (za 63,3 %) in ne v tumorskem tkivu. Mediana tumorskih vzorcev je bila 9,82, mediana kontrolnih vzorcev pa

15,52. Izražanje gena *S14* je bilo 1,58-krat višje v kontrolnem, navidezno zdravem tkivu. Wilcoxonov test je pokazal, da je bila razlika statistično značilna ($p = 0,007$).

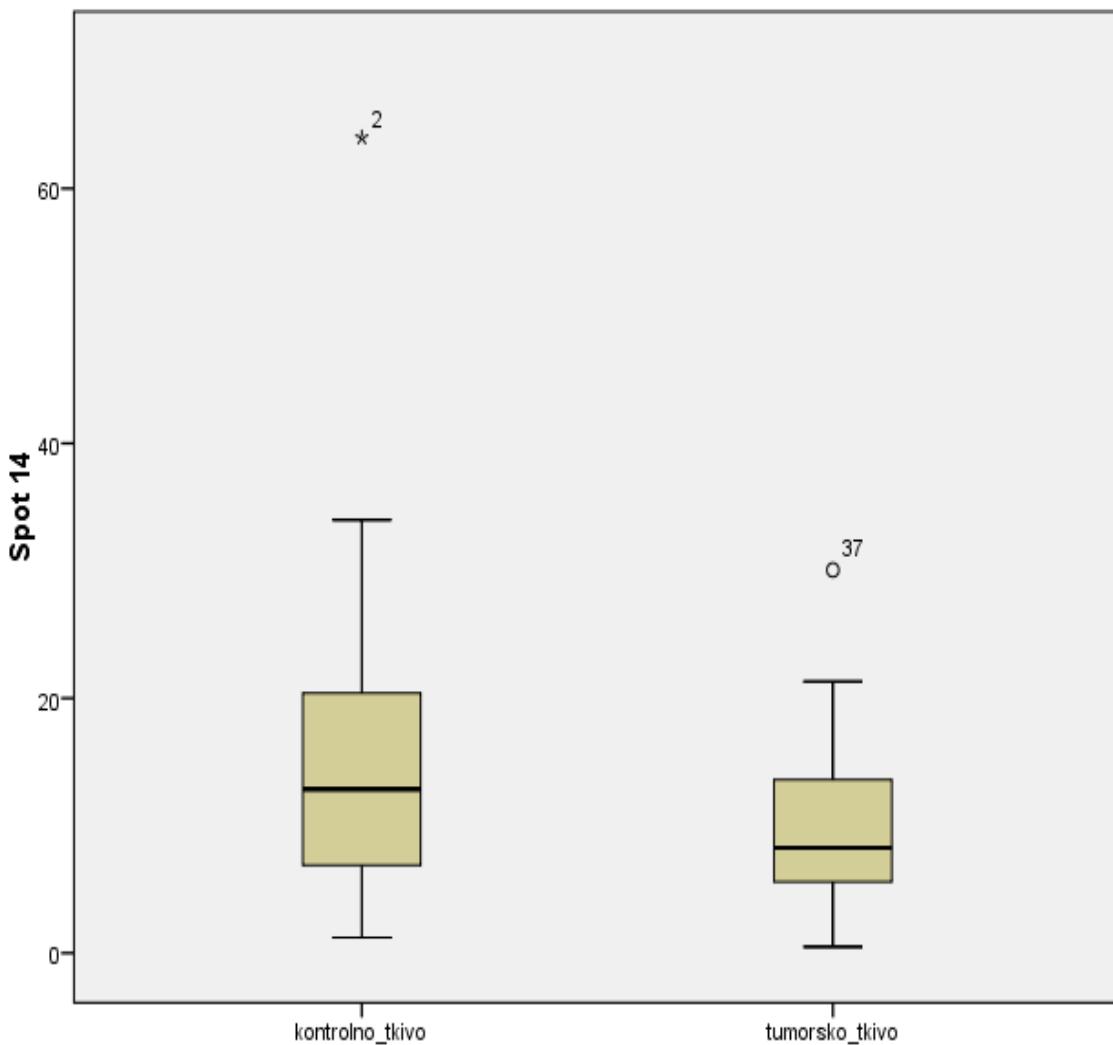
14 od 41 (34 %) bolnikov je imelo višje izražanje gena v tumorskem tkivu, 27 od 41 (66 %) bolnikov pa je imelo višje izražanje gena *S14* v kontrolnem tkivu.

Rezultati so predstavljeni v Preglednici VIII in na Sliki 6.

Preglednica VIII: Primerjava izraženosti gena *S14* v obolenem in zdravem tkivu.

	<i>N</i>	25 <i>percentil</i>	75 <i>percentil</i>	<i>Min.</i>	<i>Max.</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>p</i>
mRNA <i>S14</i> v kontrolnem tkivu	41	6,78	20,44	1,21	64,00	15,52	11,96	0,007*
mRNA <i>S14</i> v tumorskem tkivu	41	5,41	13,89	0,50	30,06	9,82	5,97	

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena, mRNA *GUS*.



Spot 14 (*S14*) je na sliki prikazan kot mRNA *S14*, relativno glede na mRNA *GUS*.

Slika 6: Grafični prikaz statistične analize izraženosti gena *S14* v kontrolnem in tumorskem tkivu.

Iz Preglednice VIII in Slike 6 je razvidno, da je izražanje gena *S14* statistično pomembno višje v kontrolnem kot v tumorskem tkivu ($p = 0,007$). Slika 6 prikazuje tudi mediano za posamezno skupino vzorcev, 1. in 3. kvartil kot mero razpršenosti, celotni razpon, osamelce ter asimetričnost porazdelitve izraženosti gena *S14* v obolelem in kontrolnem tkivu. Osamelec (°) prikazan pri tumorskem tkivu je zunaj intervala $Q_3 + 1,5Q$, ekstremni osamelec pri kontrolnem tkivu (*) pa je zunaj intervala $Q_3 + 3Q$.

Glede na to, da se rezultati naše raziskave ne ujemajo z rezultati študije raka dojk, bi morda razlog morali iskati v morfologiji obeh tkiv.

Opraviti bi morali še bolj razširjeno raziskavo, ki bi vključevala več vzorcev in več primerov posameznih histoloških tipov raka. Glede na to, da je višje izražanje gena za *S14* povezano z morfološkim tipom tumorja pri raku dojke in z invazivnostjo raka, je možno, da smo v naši raziskavi merili izražanje gena *S14* pri premalo bolnikih z najbolj napredajočim stadijem bolezni, kjer bi bilo mogoče izražanje gena *S14* višje v tumorskem tkivu. Pljučni raki v stadiju IV (že prisotni zasevki) se namreč ne operirajo in takšna tkiva so za preiskave običajno nedostopna.

4.2.2 Korelacija med izražanjem *Spot 14* v tumorskem in kontrolnem tkivu

Ker smo v naši raziskavi primerjali tumorsko in kontrolno tkivo istega bolnika, nas je zanimalo, ali med obema tkivoma obstaja povezava v izražanju gena. Spearmanov test korelacije je pokazal, da izražanje gena *S14* v tumorskem tkivu ne korelira z izražanjem *S14* v kontrolnem tkivu ($r = 0,101$; $p = 0,529$). To pomeni, da zvišano izražanje ni značilno le za tumorsko ali kontrolno tkivo, ampak je do zvišanega izražanja gena prišlo v obeh tkivih bolnika. Naša predvidevanja so bila, da bo izražanje gena *S14* zvišano v tumorskem tkivu, v kontrolnem pa znižano. Tako bi bila rast in razvoj tumorja lahko utemeljena s povečano količino endogenih maščobnih kislin. Rezultati izražanja gena v tumorskem tkivu pa so se spreminali neodvisno od izražanja v kontrolnem tkivu. Verjetno so mehanizmi izražanja v tumorskem tkivu drugačni kot v kontrolnem tkivu, ali pa je populacija celic v obeh tkivih različna. Če bi imele tumorske in ostale celice enak mehanizem izražanja, bi moralno izražanje v obeh tkivih medsebojno korelirati.

Preglednica IX: Korelacija prisotnosti gena *S14* v obolelem in kontrolnem tkivu.

<i>Spermanov Rho</i>	<i>p</i>
0,101	0,529

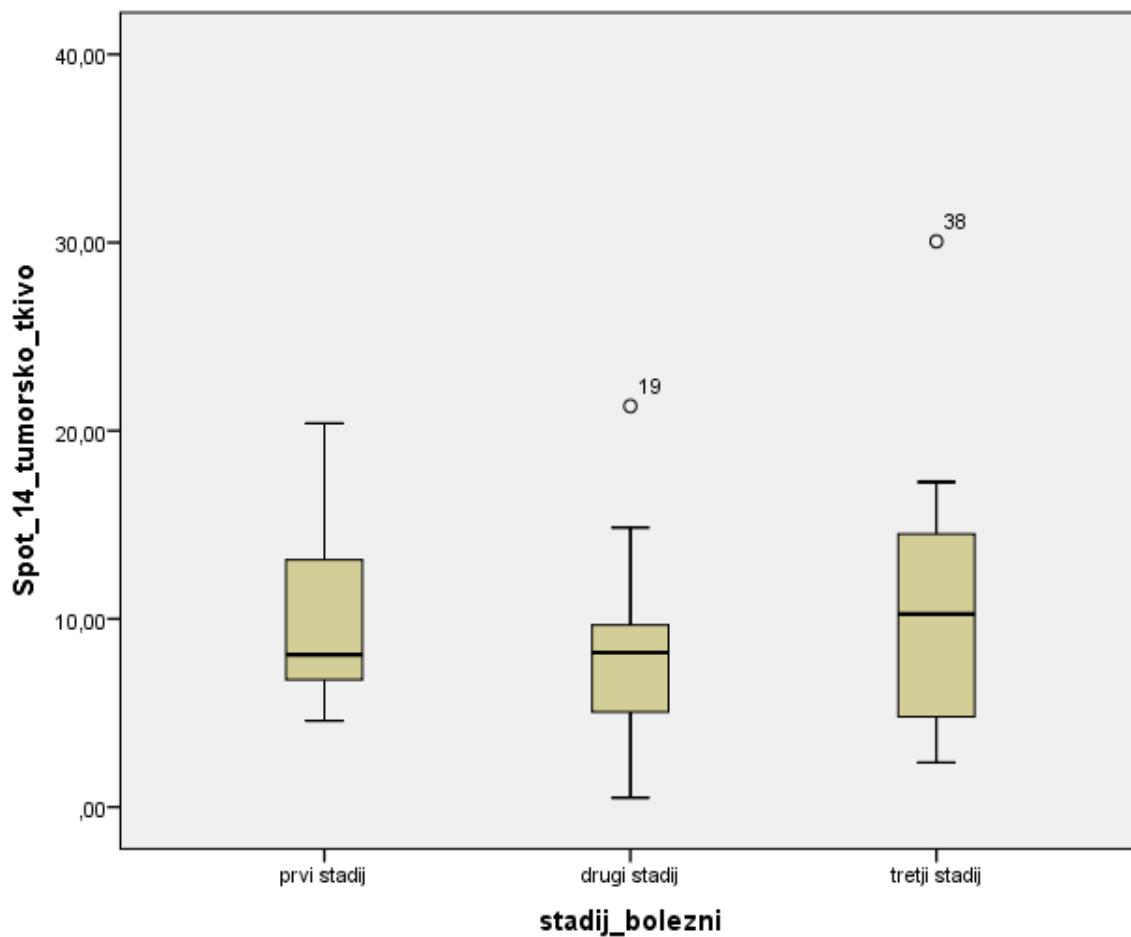
4.2.3 Izražanje gena *Spot 14* v tumorskem tkivu glede na stadij bolezni

Predvidevali smo, da bo v višjih stadijih bolezni više tudi izražanje gena *S14* v tumorskem tkivu, kar bi pomenilo, da ima tumorsko tkivo v višjem stadiju raka večje energetske potrebe in zato višjo *de novo* sintezo maščobnih kislin, pri kateri sodeluje tudi *S14*. Po statistični obdelavi rezultatov analize se je izkazalo, da izražanje gena za *S14* ne korelira s stadijem bolezni (I.-III.) ($p = 0,679$).

Preglednica X: Primerjava izraženosti gena *S14* v tumorskem tkivu glede na stadij bolezni.

Stadij	N	25 percentil	75 percentil	Min.	Max.	M	SD	p
mRNA <i>S14</i> v tumorskem tkivu pri stadiju I	16	6,72	13,65	4,58	20,39	10,11	4,82	0,679
mRNA <i>S14</i> v tumorskem tkivu pri stadiju II	13	4,13	12,05	0,50	21,31	8,56	5,65	
mRNA <i>S14</i> v tumorskem tkivu pri stadiju III	12	4,57	14,97	2,37	30,06	10,81	7,75	

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena, mRNA *GUS*.



Spot 14 (*S14*) je na sliki prikazan kot mRNA *S14*, relativno glede na mRNA *GUS*.

Slika 7: Statistična analiza izraženosti gena *S14* v obolelem tkivu glede na različne stadije tumorske bolezni.

Iz Preglednice X in Slike 7 lahko razberemo, da ni statistično pomembne razlike v izraženosti gena *S14* v obolelem tkivu glede na stadij same bolezni ($p = 0,679$). Slika 7 prikazuje tudi mediano, 1. in 3. kvartil kot mero razpršenosti, celotni razpon, osamelce ter asimetričnost porazdelitve izraženosti gena *S14* v obolelem tkivu pri različnih stadijih bolezni.

S14 je bil predmet raziskave tudi pri raku na dojki. Ker je večina rakov dojke lipogeničnih, so za rast in razvoj odvisni od maščobnih kislin in definirani z visoko količino sintaze maščobnih kislin (FASN). *S14* je jedrski protein, ki aktivira gene, potrebne za sintezo maščobnih kislin. Gen *S14* je povišan v približno 15 % raka dojke, vendar je klinična korelacija za njegovo izražanje še neznana. Pri imunohistokemični

analizi raka dojke so analizirali 131 primerov za FASN in S14. Rezultati so pokazali, da sta S14 in FASN povezana z velikostjo tumorja ($p = 0,005$ za S14, $p = 0,038$ za FASN), vendar pa ne s stadijem bolezni. Rezultati izražanja *S14* korelirajo s stopnjo tumorja, in sicer v obeh primerih; DCIS (= ductal carcinoma in situ) ($p = 0,003$) in v invazivnih primerih ($p < 0,001$). Invazivni primeri s šibkim obarvanjem S14 po 300 dneh spremeljanja niso kazali ponovitve. Nizka stopnja izražanja *S14* je povezana z dolgotrajnim preživetjem v invazivnih primerih, vključno s tistimi, ki imajo oddaljene zasevke v bezgavkah. Visoko izražanje *S14* določa visoko tveganje raka dojke in daje molekularno korelacijo s histološkimi značilnostmi ponovitve (53).

S14 torej tudi pri raku dojke ne korelira s stadijem bolezni. Vendar pa naši rezultati niso popolnoma primerljivi z rezultati študije na raku dojke, saj študiji temeljita na različnih analizah. Za popolno primerljivost bi morali naše vzorce analizirati še imunohistokemično.

Zgoraj opisana študija opisuje še korelacijo visokega izražanja *S14* z agresivnostjo tumorja pri raku dojke, medtem ko je preživetje pacientov, ki imajo nizko stopnjo izraženosti *S14*, dolgotrajno tudi v invazivnih primerih rakov. Te podatke bi lahko deloma primerjali z našimi rezultati o izražanju *S14* v obolelem in kontrolnem tkivu pri preživelih in pokojnih bolnikih 4 leta po operaciji (4.2.7) in z rezultati o izražanju *S14* T/K v skupini pokojnih udeležencev, glede na čas spremeljanja preživetja (4.2.8). Rezultati so si nasprotuječi, saj smo v naši raziskavi ugotovili, da imajo preživelci bolniki 4 leta po operaciji 1,46-krat višje izražanje *S14* v tumorskem tkivu, medtem ko bi glede na zgoraj opisano študijo pričakovali višje izražanje *S14* pri pokojnih bolnikih. Tudi primerjava izraženosti gena *S14* T/K nasprotuje ugotovitvam iz raziskave o študiji raka dojke. Rezultati naše analize so pokazali, da imajo pokojni bolniki, katerih čas spremeljanja je bil daljši (2,31-4,50 let), 3,07-krat višje izražanje *S14* T/K kot bolniki, ki so preminuli po krajšem času spremeljanja. Vendar pa razlike v obeh primerih niso bile statistično pomembne. Razlike v rezultatih obeh raziskav pa bi lahko iskali tudi v zasnovi analiz. Mi smo namreč analizirali tumorsko in kontrolno tkivo, oba vzorca pa sta bila odvzeta in primerjana pri istem bolniku. Podobne študije o izražanju *S14* pri katerih drugih tumorjih nismo zasledili. Rezultate bi bilo tudi v tem primeru potrebno analizirati še imunohistokemično.

4.2.4 Izražanje gena *Spot 14* v tumorskem tkivu glede na histološki tip bolezni

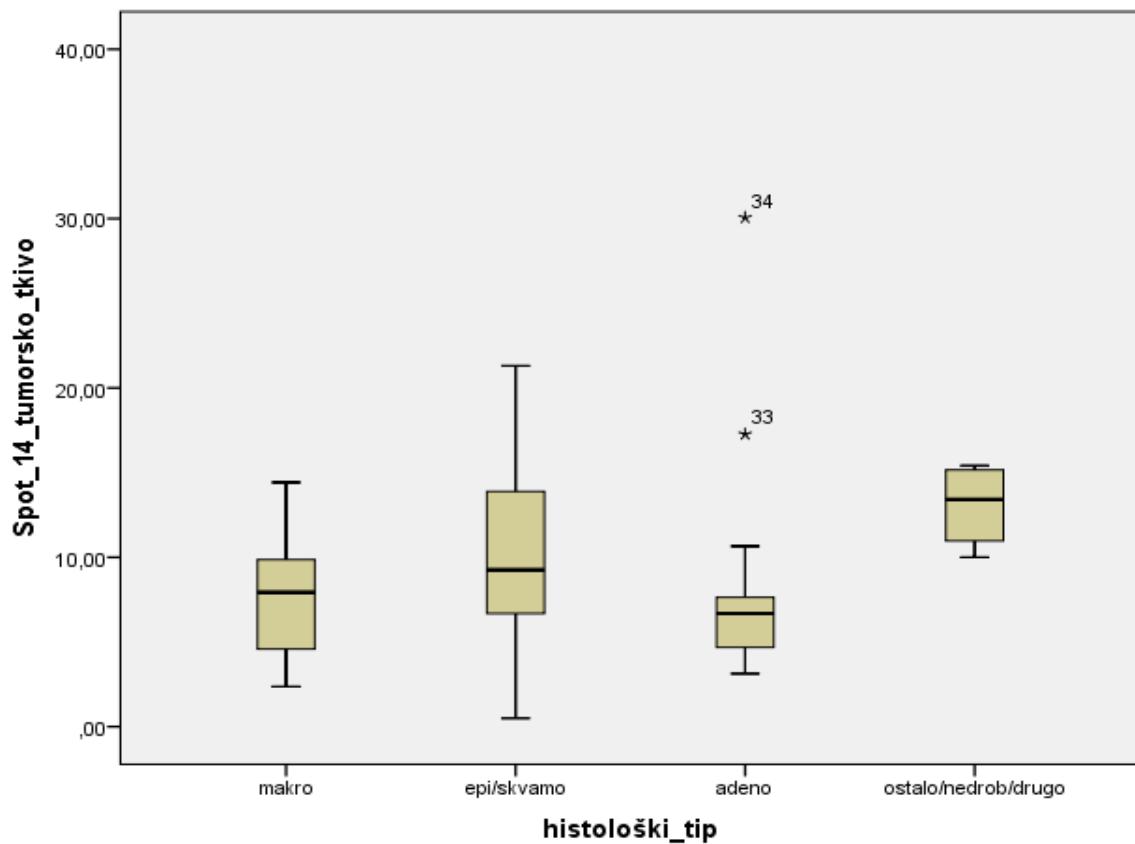
Vzorci pljučnih tumorjev bolnikov so se razlikovali po histoloških tipih. Pri pregledu histološkega tipa tumorja je največje število bolnikov imelo ploščatoceličnega raka (razvije se iz ploščatih epitelnih celic) in adenokarcinom (razvije se iz žleznih celic). Ugotoviti smo žeeli, ali obstaja razlika med posameznimi histološkimi tipi raka v izražanju *S14*.

Rezultati statistične analize so pokazali, da je izražanje *S14* v tumorskem tkivu 1,21-krat višje v ploščatoceličnem tipu raka kot v žleznem tipu raka. To ni bilo v skladu z našimi pričakovanji, saj smo pričakovali, da bo izražanje gena višje v žleznem histološkem tipu, za katerega je znano, da je agresivnejši in tako povezan s krajšim preživetjem bolnika. Izražanje *S14* v tumorskem tkivu je 1,33-krat višje v ploščatoceličnem tipu raka kot v velikoceličnem tipu raka.

Preglednica XI: Primerjava izraženosti gena *S14* v tumorskem tkivu glede na histološki tip.

Histološki tip	N	25 percentil	75 percentil	Min.	Max.	M	SD	p
Velikocelični tip (makro)	5	3,48	12,15	2,37	14,42	7,83	4,69	0,107
Ploščatocelični tip (epi/skvamo)	19	5,58	14,16	0,50	21,31	10,45	5,62	
Žlezni tip (adeno)	13	4,18	9,15	3,13	30,06	8,67	7,44	
nedrob/drugo	4	10,49	15,29	10,01	15,42	13,06	2,55	

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena, mRNA *GUS*.



Spot 14 (*S14*) je na sliki prikazan kot mRNA *S14*, relativno glede na mRNA *GUS*.

Slika 8: Statistična analiza izraženosti gena *S14* v obolenem tkivu glede na različne histološke tipe.

Iz Preglednice XI in Slike 8 lahko razberemo, da ni statistično pomembne razlike v izraženosti gena *S14* v obolenem tkivu glede na histološki tip bolezni ($p = 0,107$). Slika 8 prikazuje tudi mediano, 1. in 3. kvartil kot mero razpršenosti, celotni razpon, osamelce ter asimetričnost porazdelitve izraženosti gena *S14* v obolenem tkivu pri različnih histoloških tipih bolezni.

Naši rezultati so torej v nasprotju s pričakovanji, vendar so trenutno težko razložljivi. Ne moremo jih primerjati z že znanimi študijami, ker nismo zasledili še nobene študije, ki bi na kateri koli način analizirala izražanje *S14* v pljučnem rakavem tkivu. Iz tega razloga bi bile potrebne nadaljnje študije, ki bi temeljile na analizi S14 na celičnem nivoju.

4.2.5 Primerjava izraženosti gena *Spot 14* v tumorskem tkivu glede na izgubo telesne teže

Znano je, da med rakovo bolezni jo in njenim napredovanjem večina bolnikov izgubi telesno težo. Izguba telesne teže je eden glavnih prognostičnih znakov slabšega preživetja in motenega odziva na specifično protirakovo terapijo.

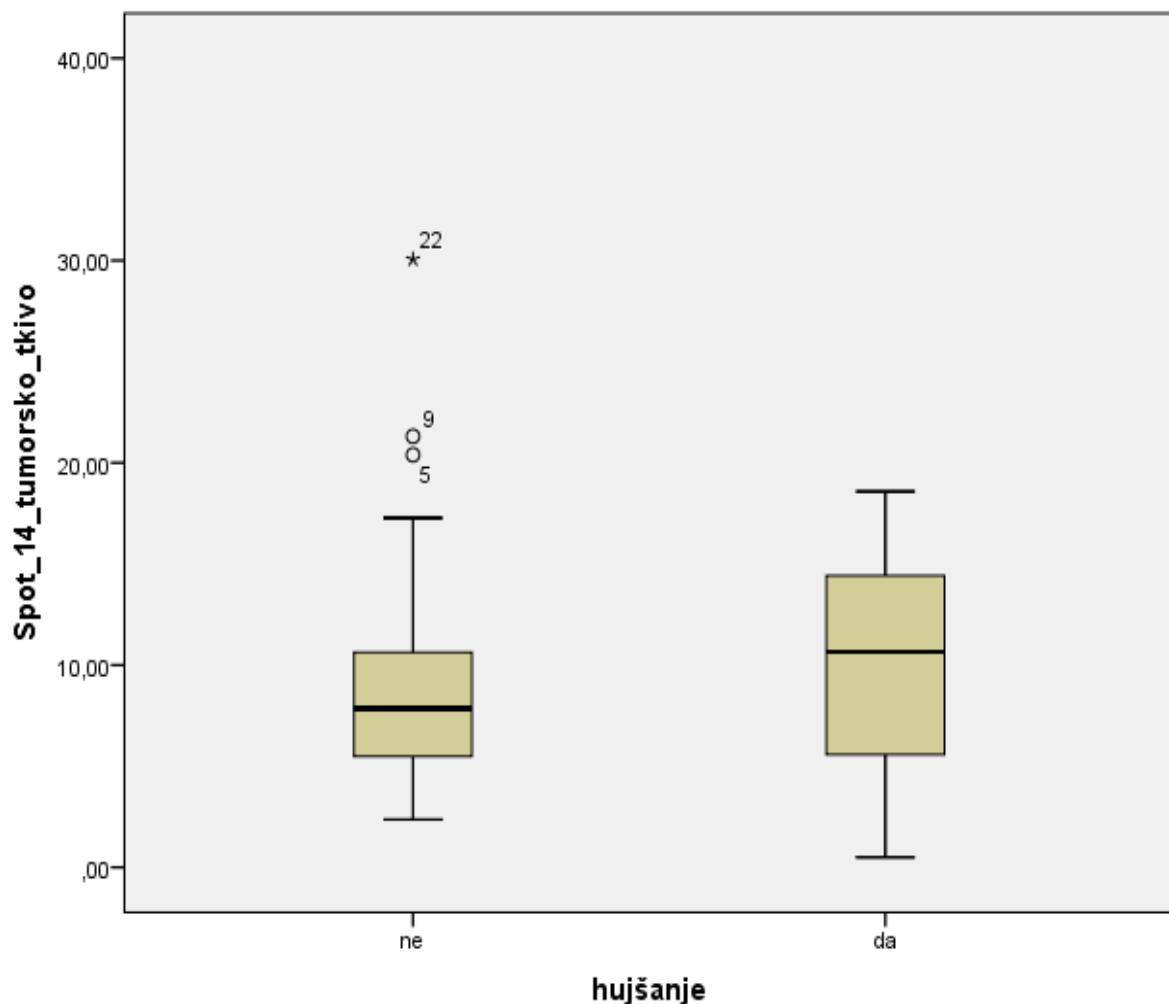
Želeli smo ugotoviti, ali je izražanje gena *S14* povezano z izgubo telesne teže v zadnjih treh mesecih pred izrezom tumorja. Primerjali smo izražanje *S14* v tumorskem tkivu bolnikov, ki niso izgubili telesne teže, s tistimi, ki so izgubili od 1 do 8 kg telesne teže.

Iz rezultatov po statistični obdelavi podatkov je razvidno, da ni statistično značilne razlike v izražanju gena *S14* v tumorskem tkivu pri bolnikih, ki so, in tistih, ki niso izgubili telesne teže (mediana 9,71 pri tistih bolnikih, ki niso izgubili telesne teže, in 9,97 pri bolnikih, ki so izgubili do 8 kg telesne teže; $p = 0,491$). 58,54 % bolnikov ni izgubilo telesne teže, 41,46 % pa jo je izgubilo.

Preglednica XII: Primerjava izraženosti gena *S14* v obolelem tkivu glede na izgubo telesne teže.

<i>hujšanje</i>	<i>N</i>	<i>25 percentil</i>	<i>75 percentil</i>	<i>Min.</i>	<i>Max.</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>p</i>
mRNA <i>S14</i> v tumorskem tkivu brez izgube telesne teže	24	5,37	10,93	2,37	30,06	9,71	6,56	0,491
mRNA <i>S14</i> v tumorskem tkivu z izgubo telesne teže	17	4,97	14,64	,50	18,59	9,97	5,21	

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena, mRNA *GUS*.



Spot 14 (*S14*) je na sliki prikazan kot mRNA *S14*, relativno glede na mRNA *GUS*.

Slika 9: Statistična analiza izraženosti gena *S14* v obolelem tkivu glede na izgubo telesne teže 1-3 mesece pred operacijo.

Iz Preglednice XII in Slike 9 lahko razberemo, da ni statistično pomembne razlike v izraženosti gena *S14* v obolelem tkivu glede na izgubo telesne teže ($p = 0,491$). Slika 9 prikazuje tudi mediano, 1. in 3. kvartil kot mero razpršenosti, celotni razpon, osamelce ter asimetričnost porazdelitve izraženosti gena *S14* v obolelem tkivu pri različnih histoloških tipih bolezni.

Rezultatov naše raziskave ne moremo primerjati, saj nismo zasledili študije, ki bi podobno obravnavala izgubo telesne teže.

Preverili smo še, ali obstaja povezava med številom izgubljenih kilogramov in izražanjem *S14* v obolelem tkivu. Rezultati so prikazani v Preglednici XIII.

Preglednica XIII: Korelacija prisotnosti gena S14 v obolelem tkivu in količino izgubljene teže v kg.

<i>Spermanov Rho</i>	<i>p</i>
0,107	0,506

Zgornja preglednica prikazuje, da korelacija med izraženostjo gena *S14* v obolelem tkivu in količino izgubljene teže v kilogramih ni statistično pomembna.

4.2.6 Primerjava izraženosti gena za Spot 14 v tumorskem tkivu glede na kajenje

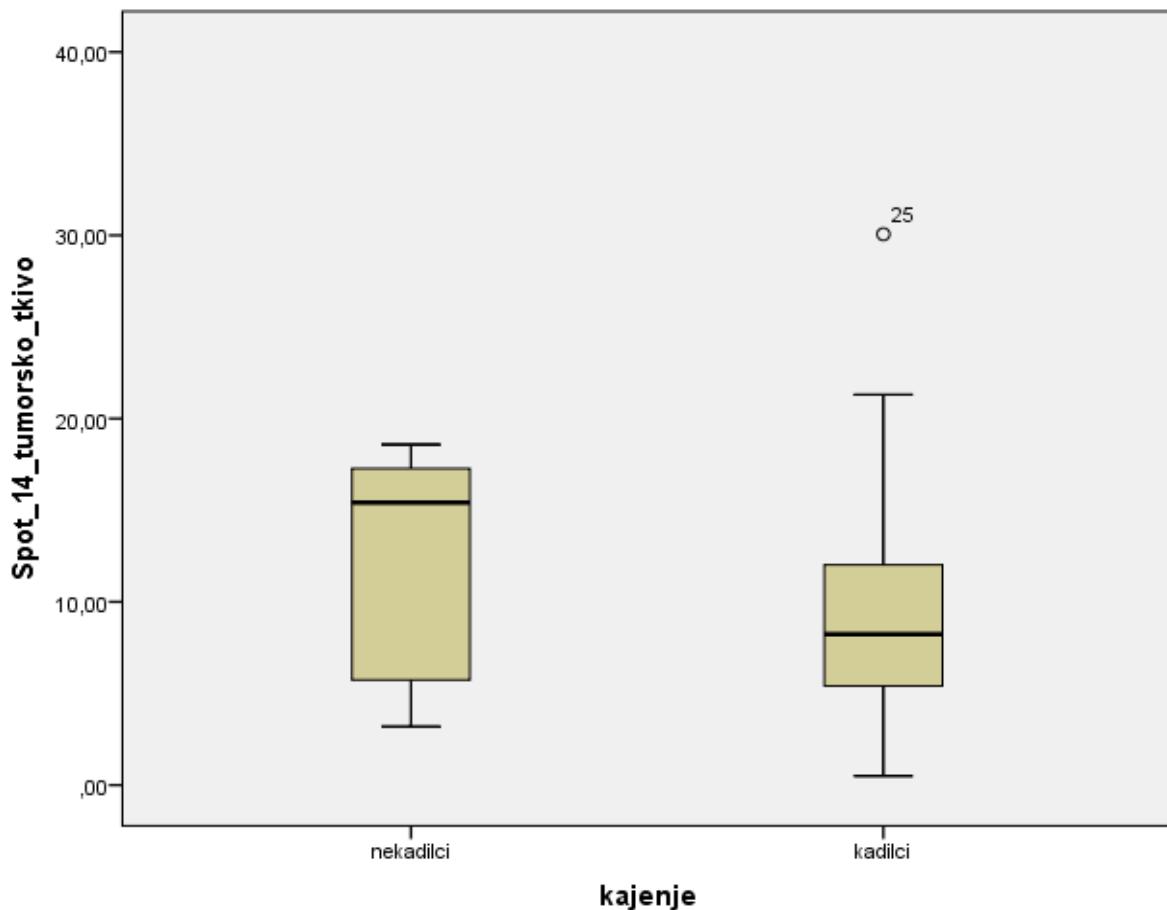
Najpomembnejši dejavnik tveganja za nastanek pljučnega raka je kajenje. V tobačnem dimu naj bi bilo več kot 1200 različnih snovi, med katerimi je veliko kancerogenih, ki povzročijo mutacije in s tem trajno okvaro DNA, ali pa so promotorji kancerogeneze.

Zato smo statistično ovrednotili razliko v izražanju gena *S14* v tumorskem tkivu bolnikov kadilcev in nekadilcev. Analiza je presenetljivo pokazala, da imajo nekadilci 1,27-krat višje izražanje gena *S14* kot kadilci in nekdanji kadilci, vendar pa razlika ni statistično signifikantna ($p = 0,403$). Rezultati raziskave nimajo visoke vrednosti, saj je bilo med preiskovanci 36 kadilcev (ali bivših kadilcev) in le 5 takih, ki niso nikoli kadili.

Preglednica XIV: Primerjava izraženosti gena S14 v obolelem tkivu glede na kajenje.

	N	25 percentil	75 percentil	Min.	Max.	M	SD	p
mRNA v tumorskem tkivu nekadilcev	5	4,47	17,93	3,20	18,59	12,04	7,06	0,403
mRNA v tumorskem tkivu kadilcev	36	5,33	12,06	0,50	30,06	9,51	5,85	

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena, mRNA GUS.



Spot 14 (S14) je na sliki prikazan kot mRNA S14, relativno glede na mRNA GUS.

Slika 10: Statistična analiza izraženosti gena S14 v obolelem tkivu glede na kajenje.

Iz Preglednice XIV in Slike 10 lahko razberemo, da ni statistično pomembne razlike v izraženosti gena *S14* v obolelem tkivu glede na kajenje ($p = 0,403$). Slika 10 prikazuje tudi mediano, 1. in 3. kvartil kot mero razpršenosti, celotni razpon, osamelce ter asimetričnost porazdelitve izraženosti gena *S14* v tumorskem tkivu pri kadilcih in nekadilcih.

Študije, ki bi opisovala izražanje gena *S14* v pljučnem rakavem tkivu, nismo zasledili. Tako ne moremo primerjati rezultatov naše raziskave. Glede na število bolnikov, ki so trenutni ali bivši kadilci, proti številu bolnikov, ki niso nikoli kadili (36:5), bi bilo potrebno raziskavo ponoviti z vzorcem, ki bi bil bolj homogen. Potrebno bi bilo analizirati večje število udeležencev in med kadilci ter nekadilci zagotoviti vsaj približno enako število. Znano je namreč, da je kajenje eden izmed najpomembnejših dejavnikov tveganja za nastanek pljučnega raka. Verjetno bi lahko že iz deleža bolnikov kadilcev, ki so bili udeleženi v raziskavi, potrdili, da je kajenje pomemben dejavnik tveganja za nastanek pljučnega raka. Vendar pa dobljeni rezultati niso potrdili statistično pomembne razlike v izražanju *S14* pri kadilcih in nekadilcih.

Preverili smo še, ali obstaja povezava med trajanjem kajenja v letih in izražanjem *S14* v obolelem tkivu. Rezultati analize so prikazani v Preglednici XV.

Preglednica XV: Korelacija prisotnosti gena *S14* v obolelem in trajanju kajenja v letih.

<i>Spermanov Rho</i>	<i>p</i>
-0,135	0,400

Preglednica XV prikazuje, da korelacija med izraženostjo gena *S14* v obolelem tkivu in trajanje kajenja ni statistično pomembna.

4.2.7 Primerjava izraženosti gena *Spot 14* v tumorskem in kontrolnem tkivu pri preživelih in pokojnih udeležencih 4 leta po operaciji

Nedrobnocelični pljučni rak (NSCLC) je najpogosteji vzrok za umrljivost, povezano z rakiom, na svetu. NSCLC je razlog za približno 80 % smrti (55). Do sedaj je bilo le nekaj primerov diagnosticiranih v zgodnji fazi tumorja. V času odkritja je bilo le 15 % bolnikov takih, ki so imeli bolezen omejeno le na pljuča, v 22 % primerov se je rak razširil na regionalne bezgavke, v 55 % primerov so bili prisotni že oddaljeni zasevki (54). Večina bolnikov z napredovalno lokalno bolezni jo ali z oddaljenimi zasevki ima kljub napredkom v terapiji slabo prognozo. 5-letno preživetje bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakom v Evropi je nizko, znaša le 11 % (55).

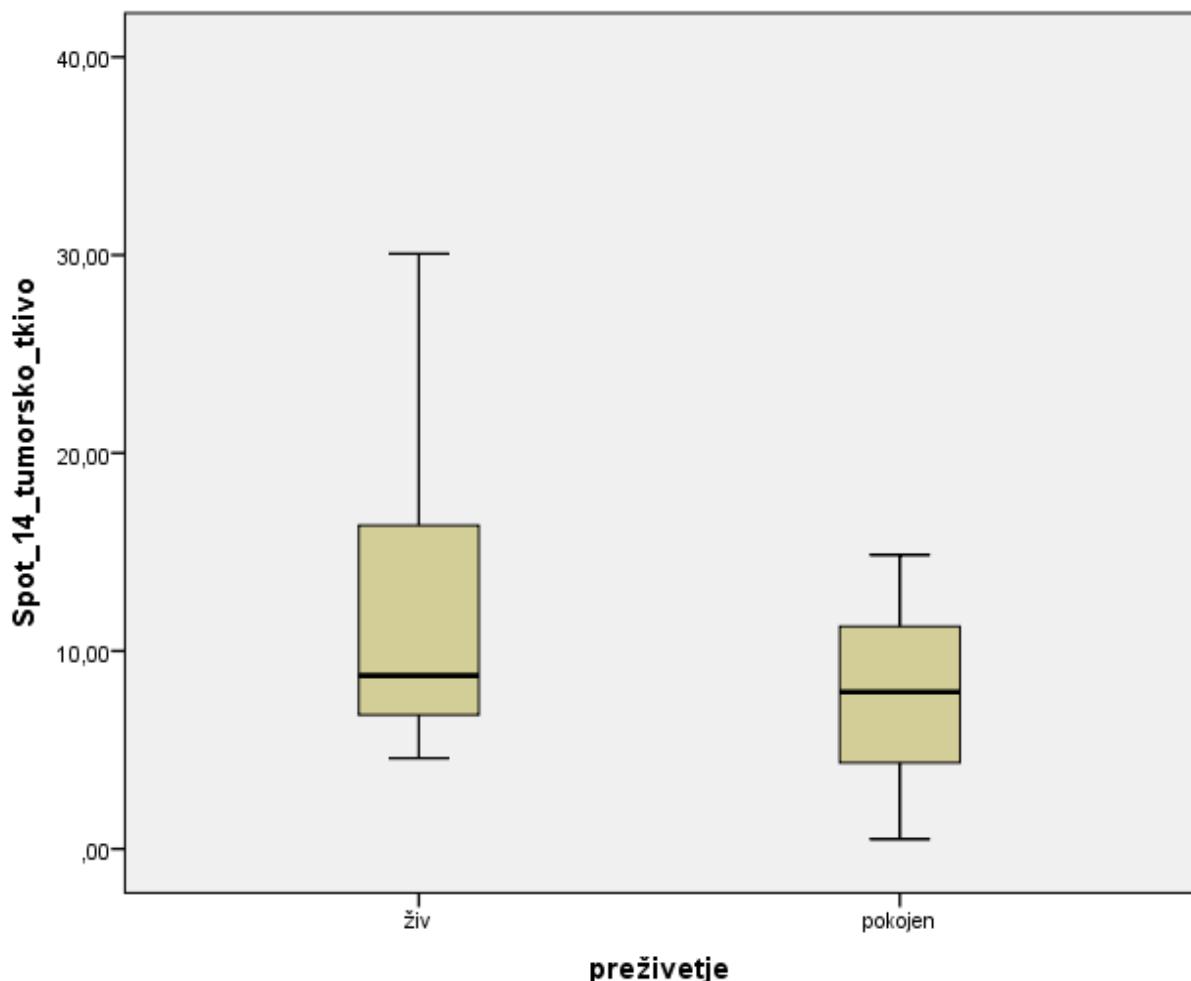
Primerjali smo izražanje gena *S14* v tumorskem tkivu med preživelimi in preminulimi bolniki 4 leta po operaciji. Pričakovali smo, da bo izražanje *S14* v tumorskem tkivu više pri bolnikih, ki so med 4-letnim spremeljanjem umrli, saj bi to potrdilo naše domneve o agresivnejšem poteku bolezni pri bolnikih z višjim izražanjem *S14*.

Rezultati analize so pokazali, da imajo preživelci bolniki 1,46-krat više izražanje *S14* v tumorskem tkivu kot pokojni bolniki, vendar pa razlika ni statistično signifikantna ($p = 0,095$). To ni v skladu z našimi pričakovanji.

Preglednica XVI: Primerjava izraženosti gena *S14* v obolenem tkivu pri preživelih in pokojnih bolnikih 4 leta po operaciji.

	<i>N</i>	<i>25 percentil</i>	<i>75 percentil</i>	<i>Min.</i>	<i>Max.</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>p</i>
mRNA <i>S14</i> v tumorskem tkivu pri preživelih	20	6,72	16,81	4,58	30,06	11,71	6,90	0,095
mRNA <i>S14</i> v tumorskem tkivu pri pokojnih	21	4,01	11,59	0,50	14,86	8,02	4,37	

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena, mRNA *GUS*.



Spot 14 (*S14*) je na sliki prikazan kot mRNA *S14*, relativno glede na mRNA *GUS*.

Slika 11: Statistična analiza izraženosti gena *S14* v obolelem tkivu pri preživelih in pokojnih bolnikih 4 leta po operaciji.

Iz Preglednice XVI in Slike 11 lahko razberemo, da ni statistično pomembne razlike v izraženosti gena *S14* v obolelem tkivu preživelih in pokojnih bolnikov 4 leta po operaciji, ($p = 0,095$). Slika 11 prikazuje tudi mediano, 1. in 3. kvartil kot mero razpršenosti, celotni razpon, osamelce ter asimetričnost porazdelitve izraženosti gena *S14* v obolelem tkivu pri osebah, ki so preživele in tistih, ki so podlegle bolezni.

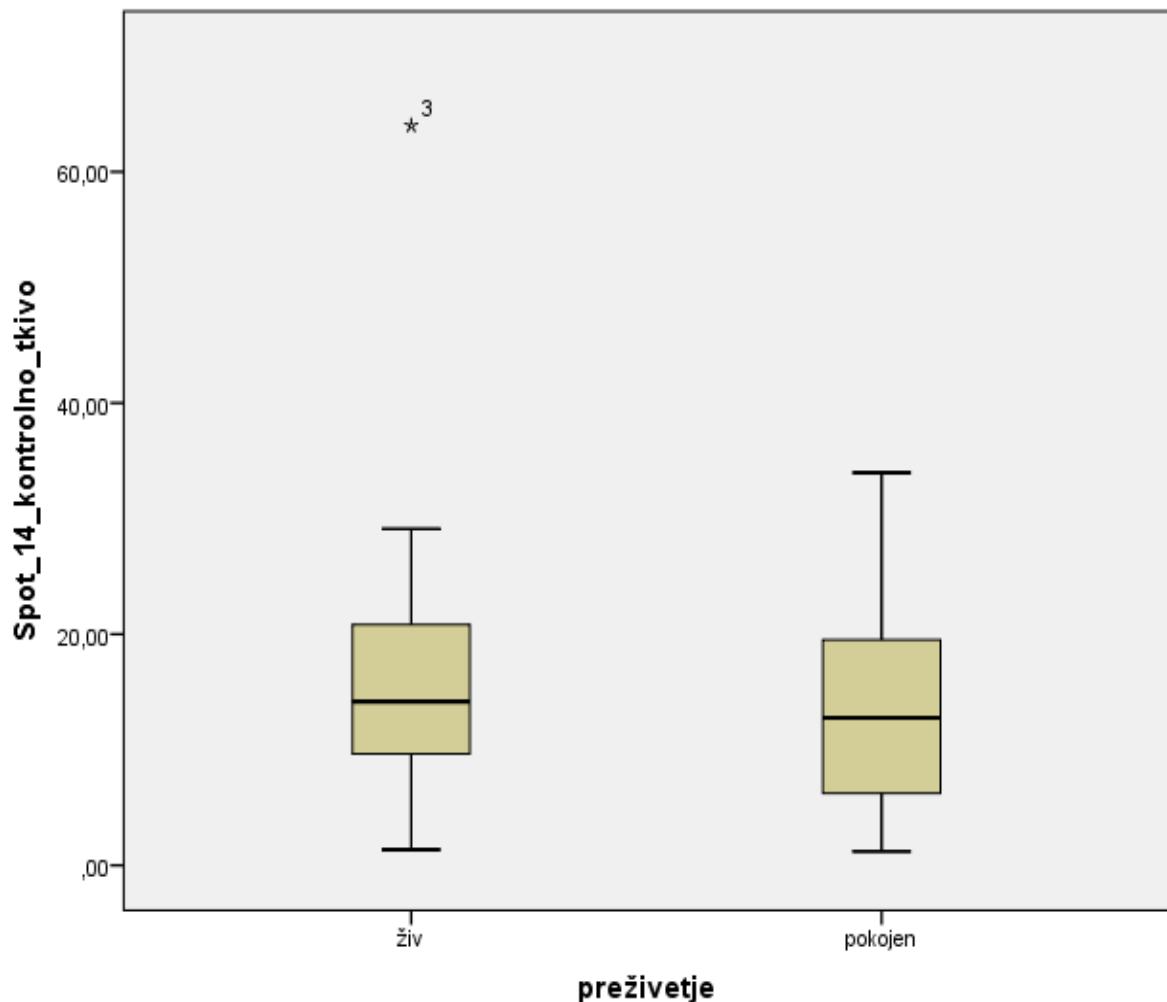
Naredili smo še statistično analizo izražanja gena *S14* v kontrolnem tkivu preživelih in pokojnih bolnikov po 4-letnjem spremeljanju. Primerjava tudi v tem primeru ni pokazala statistično signifikantne razlike ($p = 0,549$). Če bi rezultati pokazali signifikantno nižje

izražanje gena v kontrolnem tkivu preminulih, bi lahko sklepali, da je zdravo tkivo izčrpano.

Preglednica XVII: Primerjava izraženosti gena S14 v kontrolnem tkivu pri preživelih in pokojnih bolnikih 4 leta po operaciji.

	N	25 percentil	75 percentil	Min.	Max.	M	SD	p
mRNA S14 v kontrolnem tkivu pri živih	20	6,72	16,81	1,35	64,00	17,05	13,99	0,549
mRNA S14 v kontrolnem tkivu pri pokojnih	21	6,01	20,01	1,21	33,98	14,06	9,78	

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena, mRNA GUS.



Spot 14 (*S14*) je na sliki prikazan kot mRNA *S14*, relativno glede na mRNA *GUS*.

Slika 12: Statistična analiza izraženosti gena *S14* v kontrolnem tkivu pri preživelih in pokojnih bolnikih 4 leta po operaciji.

Iz Preglednice XVII in Slike 12 lahko razberemo, da 4 leta po operaciji ni statistično pomembne razlike v izraženosti gena *S14* v obolenem tkivu preživelih in pokojnih bolnikov ($p = 0,549$). Slika 12 prikazuje tudi mediano, 1. in 3. kvartil kot mero razpršenosti, celotni razpon, osamelce ter asimetričnost porazdelitve izraženosti gena *S14* v obolenem tkivu pri osebah, ki so preživele in tistih, ki so podlegle bolezni.

Študija, ki je preučevala agresivnost raka na dojki glede na izražanje *S14*, je že bila narejena. Z imunološkimi metodami so merili izražanje *S14* v vzorcih raka dojke in jih

primerjali s kontrolnimi vzorci, kjer izražanje *S14* ni bilo povečano. Ugotovili so, da je povečano izražanje *S14* marker za agresivnost raka dojke. Frekvenca višjega izražanja *S14* korelira s stadijem tumorja v primerih raka dojke *in situ* in tudi v invazivnih primerih. Stopnja izražanja je povezana tudi z velikostjo tumorja. *S14* je potreben za rast in preživetje celic raka dojke, zaviranje izražanja *S14* pa povzroči apoptozo celic. Z odkrivanjem nivoja izražanja *S14* v vzorcu bolnika in primerjavo izražanja s kontrolnim vzorcem se lahko napove, ali ima osebek agresivno ali ne-agresivno obliko raka, s tem pa tudi število let preživetja ob zdravljenju (56).

Rezultati naše raziskave so v nasprotju z zgoraj opisano študijo. Tako v primerjavi izraženosti gena *S14* v tumorskem tkivu pri preživelih in pokojnih udeležencih 4 leta po operaciji, kot tudi v izraženosti gena *S14* v kontrolnem tkivu, rezultati niso pokazali statistično pomembne razlike. Izražanje *S14* je bilo v tumorskem in kontrolnem tkivu višje pri preživelih bolnikih. Glede na izsledke že opravljenih študij o agresivnosti raka dojke in o možnosti napovedovanja preživetja pa bi pričakovali, da bodo imeli pokojni bolniki višje izražanje *S14* vsaj v tumorskem tkivu. Vendar pa raziskave, ki bi opisovala pljučno rakovo tkivo, nismo zasledili, zato bi bile potrebne nadaljnje analize.

4.2.8 Primerjava izraženosti gena Spot 14 T/K v skupini pokojnih udeležencev glede na čas preživetja

Naredili smo še primerjave izraženosti gena *S14* T/K z nekaterimi opazovanimi kliničnimi znaki. V zgoraj opisanih rezultatih smo posamično analizirali *S14* v tumorskem tkivu in *S14* v kontrolnem tkivu. V nadaljevanju pa smo analizirali razmerje $S14_{\text{tumor}}/S14_{\text{kontrola}}$. Te kvociente smo primerjali s preživetjem v skupini pokojnih udeležencev, s hujšanjem v zadnjih treh mesecih in s stadijem bolezni.

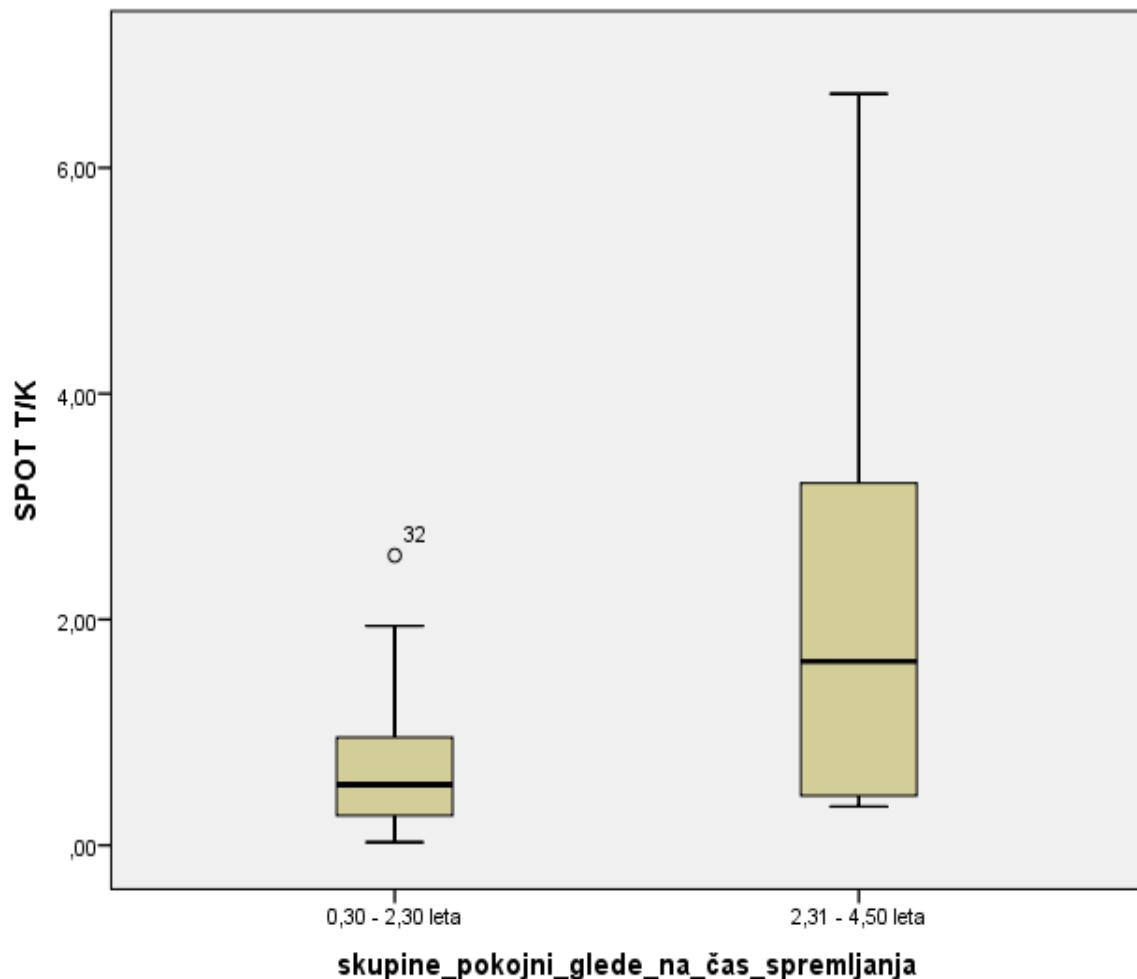
Najprej smo primerjali izražanje gena *S14* T/K v skupini pokojnih udeležencev, in sicer glede na čas preživetja po operaciji (koliko let po operaciji je še živeč do smrti). Razdelili smo jih v dva razreda, prvi razred so predstavljali udeleženci v raziskavi, ki smo jih spremljali 0,3-2,3 leta, drugi razred pa so predstavljali pacienti, ki so umrli po 2,31-4,50 let spremeljanja, in jih analizirali z Mann-Whitneyjevim testom.

Rezultati analize so pokazali, da imajo pokojni bolniki, katerih čas spremljanja oz. preživetja je bil 2,31-4,50 let, 3,07-krat višje izražanje *S14 T/K* kot bolniki, ki so preminuli po krajšem času spremljanja. Vendar pa razlika ni statistično signifikantna ($p = 0,172$). Pričakovali smo, da bo izražanje *S14 T/K* višje pri bolnikih, ki so prej podlegli bolezni, to je v skupini 0,3-2,3 let spremljanja. To bi potrdilo našo domnevo, da višje izražanje gena *S14* nakazuje agresivnejši potek bolezni, s tem pa slabšo prognozo in hitrejšo smrt bolnika.

Preglednica XVIII: Primerjava izraženosti gena *S14 T/K* v skupini pokojnih udeležencev, glede na čas preživetja.

Čas spremljanja	N	25 percentil	75 percentil	Min.	Max.	M	SD	p
0,30 – 2,30 leta	14	0,24	0,99	0,03	2,57	0,74	0,72	0,172
2,31 – 4,50 leta	7	0,38	4,61	0,34	6,66	2,27	2,44	

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena, mRNA *GUS*.



Spot T/K (*S14* T/K) je na sliki prikazan kot mRNA *S14*, relativno glede na mRNA *GUS*.

Slika 13: Statistična analiza izraženosti *S14* T/K pri pokojnih bolnikih glede na čas spremļjanja.

Iz Preglednice XVIII in Slike 13 lahko razberemo, da ni statistično pomembne razlike v izraženosti gena *S14* T/K pri pokojnih bolnikih glede na čas spremļjanja ($p = 0,172$) po operaciji. Slika 13 prikazuje tudi mediano, 1. in 3. kvartil kot mero razpršenosti, celotni razpon, osamelce ter asimetričnost porazdelitve izraženosti gena *S14* T/K glede na čas spremļjanja pri osebah, ki so podlegle bolezni.

Tudi analiza izraženosti gena *S14* T/K v skupini pokojnih udeležencev glede na čas preživetja je nasprotovala dosedanjim znamenitostim, ki so bile narejene na raku dojke. Vendar pa nismo zasledili še nobene raziskave, ki bi proučevala pljučni rak. Prav tako

nismo zasledili študije, ki bi imela podobno zasnovo za analiziranje, to je, da smo merili in primerjali tumorske in kontrolne vzorce izražanja *S14* istega bolnika.

Preverili smo tudi, ali obstaja povezava med izraženostjo gena *S14* T/K pri pokojnih bolnikih in časom spremeljanja (v letih po operaciji) do smrti bolnika.

Preglednica XIX: Korelacija prisotnosti gena *S14* T/K pri pokojnih bolnikih in časom spremeljanja le-teh.

<i>Spermanov Rho</i>	<i>p</i>
0,111	0,633

Iz Preglednice XIX je razvidno, da korelacija med prisotnostjo gena *S14* T/K pri pokojnih bolnikih in časom spremeljanja ni statistično pomembna.

4.2.9 Primerjava prisotnosti gena *Spot 14* T/K glede na poročanje udeležencev o hujšanju v zadnjih treh mesecih

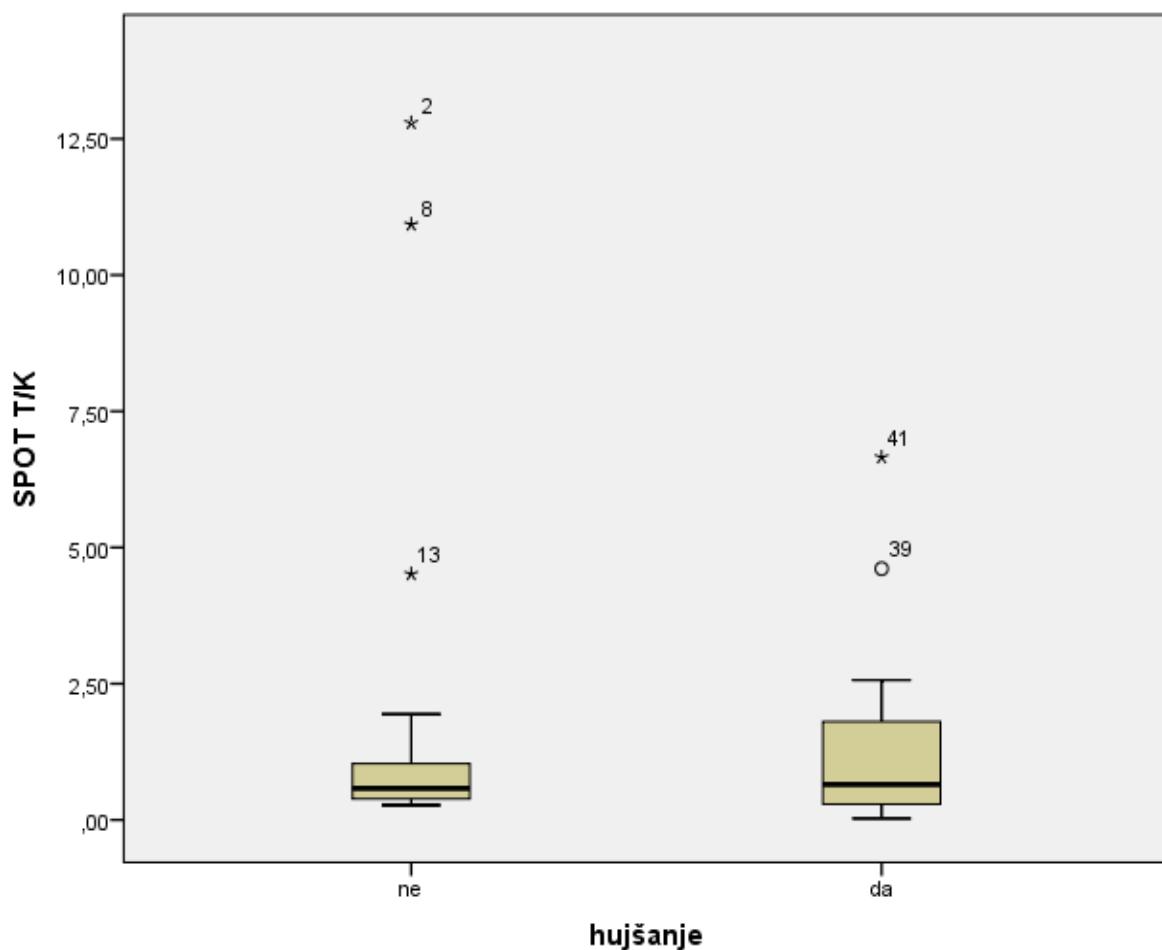
Primerjali smo izražanje *S14* T/K glede na hujšanje oziroma ne-hujšanje bolnikov v zadnjih treh mesecih pred operacijo. Podatke smo prav tako analizirali z Mann-Whittneyjevim testom.

Rezultati analize so pokazali, da imajo bolniki, ki v zadnjih treh mesecih pred operacijo niso shujšali, 1,26-krat višje izražanje razmerje *S14* T/K kot bolniki, ki so v zadnjih treh mesecih shujšali. To ni v skladu z našimi pričakovanji, saj bi sklepali, da višje izražanje *S14* T/K in s tem slabša prognoza ter hitrejši potek bolezni povzročita hujšanje pri bolnikih. Vendar pa razlika ni statistično signifikantna ($p = 0,853$).

Preglednica XX: Primerjava izraženosti gena *S14 T/K* glede na poročanje o hujšanju v zadnjih treh mesecih.

Hujšanje	N	25 percentil	75 percentil	Min.	Max.	M	SD	p
Ne	24	0,38	1,03	0,27	12,79	1,77	3,25	0,853
Da	17	0,28	2,02	0,03	6,66	1,41	1,80	

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena, mRNA *GUS*.



Spot T/K (*S14 T/K*) je na sliki prikazan kot mRNA *S14*, relativno glede na mRNA *GUS*.

Slika 14: Statistična analiza izraženosti *S14 T/K* glede na poročanje o hujšanju v zadnjih treh mesecih.

Iz Preglednice XX in Slike 14 lahko razberemo, da ni statistično pomembne razlike v izraženosti gena *S14* T/K glede na poročanje o hujšanju v zadnjih treh mesecih pred operacijo ($p = 0,853$). Slika 14 prikazuje tudi mediano, 1. in 3. kvartil kot mero razpršenosti, celotni razpon, osamelce ter asimetričnost porazdelitve izraženosti gena *S14* T/K glede na poročanje o hujšanju v zadnjih treh mesecih.

Ko smo primerjali izraženost gena *S14* v obolelem tkivu glede na izgubo telesne teže, nismo ugotovili statistično pomembne razlike. Tudi korelacija med izraženostjo *S14* v tumorskem tkivu in količino izgubljenih kilogramov statistično ni pomembna. Rezultati primerjave izraženosti razmerja *S14* T/K so prav tako podobni. V izraženosti gena *S14* T/K glede na poročanje o hujšanju v zadnjih treh mesecih ni statistično pomembne razlike, korelacija (analizirano s Spearmanovim testom) ni statistično pomembna ($p = 0,772$).

Rezultatov te analize ne moremo primerjati z nobeno študijo, saj podobnih raziskav v literaturi nismo zasledili.

4.2.10 Primerjava izraženosti gena *Spot 14* T/K glede na stadij bolezni

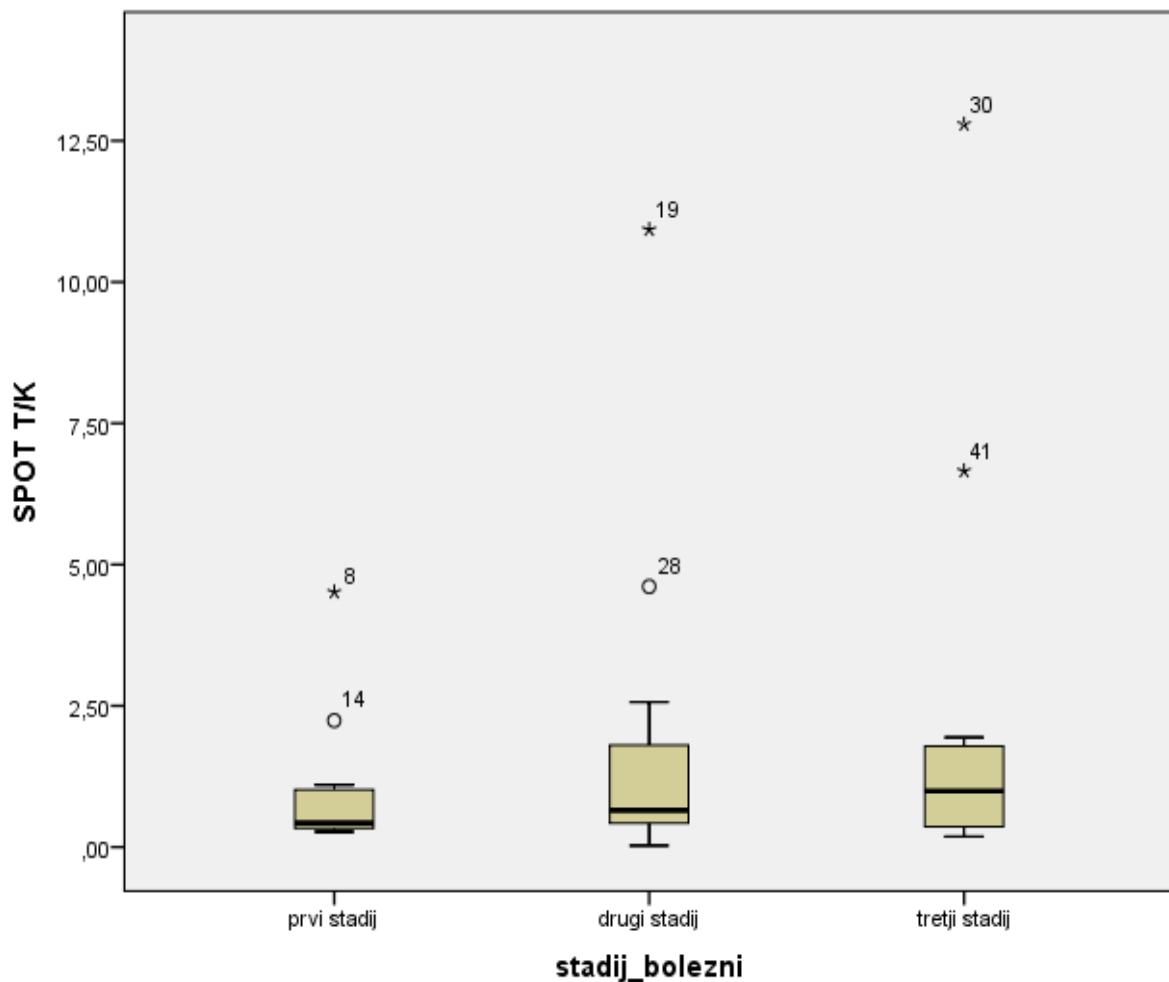
Primerjali smo tudi izražanje *S14* T/K glede na stadij bolezni. Podatke smo analizirali s Kruskal-Wallisevim testom.

Rezultati analize so pokazali, da imajo bolniki v tretjem stadiju bolezni 1,27-krat višje izražanje *S14* T/K kot bolniki z drugim stadijem bolezni in 2,56-krat višje izražanje kot bolniki s stadijem ena. To potrjuje naša pričakovanja. Višje izražanje *S14* T/K pomeni slabšo prognozo in agresivnejši potek bolezni, kar sovpada z višjim stadijem bolezni. Vendar pa razlika ni statistično signifikantna ($p = 0,650$).

Preglednica XXI: Primerjava izraženosti gena *S14 T/K* glede na stadij bolezni.

Stadij	N	25 percentil	75 percentil	Min.	Max.	M	SD	p
Stadij 1	16	0,32	1,02	0,27	4,51	0,91	1,09	0,650
Stadij 2	13	0,40	2,18	0,03	10,93	1,83	3,01	
Stadij 3	12	0,35	1,86	0,19	12,79	2,33	3,74	

Vrednosti so standardizirane na izražanje hišnega gena, mRNA *GUS*.



Spot T/K (*S14 T/K*) je na sliki prikazan kot mRNA *S14*, relativno glede na mRNA *GUS*.

Slika 15: Statistična analiza izraženosti *S14 T/K* glede na stadij bolezni.

Iz Preglednice XXI in Slike 15 lahko razberemo, da ni statistično pomembne razlike v izraženosti gena *S14* T/K glede na stadij bolezni ($p = 0,650$). Slika 15 prikazuje tudi mediano, 1. in 3. kvartil kot mero razpršenosti, celotni razpon, osamelce ter asimetričnost porazdelitve izraženosti gena *S14* T/K glede na stadij bolezni.

Čeprav rezultati izpolnjujejo naša pričakovanja, jih ne moremo primerjati z ostalimi raziskavami, saj študij, ki bi na podoben način raziskovale izražanje *S14* v pljučnem rakavem tkivu in le to primerjale s kontrolnim tkivom istega bolnika, nismo zasledili. Da bi potrdili dobljene rezultate, bi bile potrebne nadaljnje raziskave razširjene na celični nivo.

4.2.11 Prognostični pomen izražanja gena *Spot 14* v tumorskem tkivu

V naši raziskavi smo proučili tudi morebiten prognostični pomen izražanja *S14*. V tem primeru smo izražanje izrazili relativno glede na kontrolno tkivo. Na podlagi Coxove regresijske analize smo ugotovili, da izražanje gena *S14* ni napovedovalo 4-letnega preživetja bolnika, torej nima prognostičnega pomena (rezultati statistične analize niso prikazani). Raziskave, ki bi do sedaj to že preučevale v pljučnem rakavem tkivu, nismo zasledili. Zato ne moremo primerjati naših rezultatov z rezultati že znanih študij.

Prognostičen pomen izražanja *S14* bi lahko primerjala le s študijo, ki je preiskovala izražanje *S14* pri tumorju dojke. V tem primeru so ugotovili, da je stopnja izražanja *S14* povezana z agresivnostjo tumorja in s tem napovedovanjem preživetja (56).

Če gledamo rezultate v celoti (živi in pokojni po operaciji, čas preživetja bolnika po operaciji, Coxova regresijska analiza), ugotovimo, da izražanje *S14* ni povezano s preživetjem bolnikov po operaciji.

4.2.12 Primerjava izražanja gena *Spot 14* in gena *FASN*

FASN je encim, ki v prisotnosti NADPH katalizira sintezo palmitata iz acetil-CoA in malonil-CoA v dolgoverižne maščone kisline. Nahaja se v Golgijemovem aparatu, mitohondrijih, glikogenskih zrncih, citoplazmi, plazemskih membranah,...

Ker imajo rakave celice povečane potrebe po maščobnih kislinah, potrebujejo tudi mehanizem, s katerim lahko pridobijo proste maščobne kisline za te namene. Ena od poti, s katero lahko pridobijo maščobne kisline, je *de novo* sinteza maščobnih kislin. FASN pa je encim, ki je sposoben *de novo* sinteze maščobnih kislin in zato je njegovo izražanje zvišano v večini človeških karcinomov.

V tkivih istih bolnikov, v katerih smo izmerili izražanje *S14*, so v preteklosti že izmerili tudi izražanje gena za *FASN*. Izražanje gena za *FASN* je bilo v kontrolnem tkivu 1,83-krat višje kot v tumorskem tkivu ($p = 0,0045$). Rezultati te raziskave so bili v nasprotju s pričakovanji.

Glede na to, da je bilo tako izražanje gena *S14*, kot tudi gena *FASN* zvišano v kontrolnem tkivu, smo naredili še primerjavo med njima. Ugotovili smo, da je izražanje gena *S14* v kontrolnem tkivu koreliralo z izražanjem gena *FASN* v kontrolnem tkivu ($r = 0,8658$, $p < 0,0001$). Tudi v tumorskem tkivu je izražanje *S14* koreliralo z izražanjem *FASN* ($r = 0,3273$, $p = 0,0367$).

Glede na to, da je izražanje *S14* in izražanje *FASN* zvišano tako v kontrolnem kot tudi tumorskem tkivu, lahko sklepamo na povezavo znotrajceličnega signaliziranja. To je skladno z vedenjem mehanizmov, ki uravnavajo izražanje genov.

5 SKLEP

Z namenom iskanja novih načinov zdravljenja nedrobnoceličnega pljučnega raka so preučili že različne načine preskrbe rakavega tkiva. Raziskave so bile narejene z LPL, sintazo višjih maščobnih kislin (FASN), LDL receptorjem in Apo E. Za dopolnitev medsebojnih korelacij, ki so bile rezultat teh raziskav, smo preučili še izražanje gena za *S14*, ki naj bi tudi sodeloval pri preskrbi rakavega tkiva z višjimi maščobnimi kislinami.

Z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času smo izmerili izražanje gena *S14* v tumorskem in sosednjem, navidezno zdravem, kontrolnem tkivu 41 bolnikov.

Naše ugotovitve:

- Izraženost gena *S14* je statistično pomembno višja v kontrolnem in ne v tumorskem tkivu.
- Korelacija med izraženostjo gena *S14* v tumorskem in kontrolnem tkivu ni statistično pomembna.
- Pri analizi izraženosti gena *S14* v tumorskem tkivu s kliničnimi znaki (stadij bolezni, histološki tip tumorja, izguba telesne teže bolnikov pred operacijo, kajenje, 4-letno preživetje bolnikov) nismo ugotovili statistično pomembne razlike.
- Pri analizi razmerja izraženosti gena $S14_{\text{tumor}}/S14_{\text{kontrola}}$ s kliničnimi znaki (čas preživetja v skupini pokojnih udeležencev, izguba telesne teže bolnikov pred operacijo, stadij bolezni) nismo ugotovili statistično pomembne razlike.
- Analiza razmerja izraženosti gena $S14_{\text{tumor}}/S14_{\text{kontrola}}$ glede na stadij bolezni je pokazala, da imajo bolniki v tretjem stadiju bolezni 1,27-krat višje izražanje *S14* T/K kot bolniki z drugim stadijem bolezni in 2,56-krat višje izražanje kot bolniki s stadijem ena. Razlika ni statistično pomembna.
- Izražanje gena *S14* v tumorskem in kontrolnem tkivu korelira z izražanjem gena *FASN* v tumorskem in kontrolnem tkivu.

6 LITERATURA

1. Debeljak A, Triller N, Kecelj P, Pompe-Kirn V, Rott T, Osolnik K in sod.: Strokovna izhodišča za internistično obravnavo bolnika s pljučnim rakom. Zdravniški vestnik 2002; 71: 385-90.

2. Global burden of cancer.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (9. 4. 2010).

Povzeto po: Setnikar T: Preučevanje izražanja gena za sintazo višjih maščobnih kislin v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu. Diplomska naloga 2010.

3. Rak v Sloveniji 2007. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2010.

4. Rott T: Epidemiologija, etiopatogeneza in histološka klasifikacija pljučnih tumorjev. Medicinski razgledi 2002; 41: 289–312.

5. Debeljak A: Zgodnja diagnostika začetnih oblik pljučnega raka. Zdravniški vestnik 2005; 74: 717-20.

6. Terčelj M: Zgodnje odkrivanje pljučnega raka. Radiology and oncology 2006; 40: 59-66.

7. An introduction to lung cancer.

<http://cancergrace.org/lung/2010/04/05/an-introduction-to-lung-cancer/> (15. 4. 2010).

Povzeto po: Setnikar T: Preučevanje izražanja gena za sintazo višjih maščobnih kislin v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu. Diplomska naloga 2010.

8. Lung cancer. The Immune Recovery Clinic of the Immune Recovery Foundation

<http://www.immunerecovery.net/Lung%20Cancer.htm> (15. 4. 2010).

Povzeto po: Setnikar T: Preučevanje izražanja gena za sintazo višjih maščobnih kislin v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu. Diplomska naloga 2010.

9. Debevec L: Pomen zamejitve bolezni in ocena sposobnosti bolnika za zdravljenje pljučnega raka. Zdravniški vestnik 2006; 389-399.

10. Bradley J. D, Ieumwananonthachai N, Purdy J. A, Wassermann T. H, Lockett M. A, Graham M. V, et al.: Gross tumor volume, critical prognostic factor in patients treated with three-dimensional conformal radiation therapy for non-small-cell lung carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2002; 52: 49-57.

11. Ball D, Smith J, Wirth A, MacManus M: Failure of T stage to predict survival in patients with non-small-cell lung cancer treated by radiotherapy with or without concomitant chemotherapy. J Radiat Oncol Biol Phys 2002; 54: 1007-13.

12. Zwitter M: Smernice za diagnostiko in zdravljenje bolnikov z rakom pljuč 2006; 1-56.

13. Macanu M. P, Hicks R. J, Ball D. L, Kalff V, Matthews J. P, Salminen E, e tal.: F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography staging in radical radiotherapy candidates with non-small cell lung carcinoma: powerful correlation with survival and high impact on treatment. Cancer 2001; 92: 886-895.

14. Shields T. W: The significance of ipsilateral mediastinal lymph node metastasis (N2 disease) in non-small cell carcinoma of lung. A commentary. J Thorac Cardiovascular Surgery 1990; 99: 48-53.

15. Debevec M, Bitenc M, Vidmar S, Rott T, Orel J, Strojan P, e tal.: Postoperative radiotherapy for radically resected N2 non-small-cell lung cancer (NSCLC): *randomised clinical study* 1988-1992. lung cancer 1996; 14: 99-107.

16. Goldstrow P: Staging, classification and prognosis. In: Hansen HH, ed. IASLC Textbook of lung cancer. London: M Dunitz 2000; 163-184.
17. Ginsberg R, Roth J, Fergusson M: Lung cancer surgical practice guidelines. Society of Surgical Oncology practice guidelines. Oncology (Huntington) 1997; 11: 889-92.
18. Mashima T, Seimiya H, Zsuruo T: De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. British Journal of Cancer 2009; 100; 1369-72.
19. Kuhajda FP: Fatty acid Synthase and Cancer: New application of an old pathway. Cancer Research 2006; 66: 5977-80.
20. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ: Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. Journal of Lipid Research 2002; 43: 1997-2006.
21. Bilač Krašnja M, Černe D: Optimizacija analiznega postopka merjenja aktivnosti lipoproteinske lipaze v rakavem tkivu. Farmacevtski vestnik 2009; 60: 21-26.
22. Trošt z, Marc J, Sok M, Černe D: Increased apolipoprotein E gene expression and protein concentration in lung cancer tissue do not contribute to the clinical assessment of non-small cell lung cancer patients. Archives of Medical Research 2008; 39; 663-667.
23. Hughes-Fulford M, Chen Y, Tjandrawinata RR: Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. Carcinogenesis 2001; 5: 701-7.
24. Krieger M: The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. Current opinion in lipidology 1997; 8: 275-80.
25. Plüddemann A, Neyen C, Gordon S: Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. Methods 2007; 43: 207-17.

26. Moncur JT, Park JP, Memoli VA, Mohandas TK, Kinlaw WB: The "Spot 14" gene resides on the telomeric end of the 11q13 amplicon and is expressed in lipogenic breast cancers: implications for control of tumor metabolism. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 6989-94.
27. Smith S: The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. FASNEB 1994; 8: 1248-59.
28. THRSP thyroid hormone responsive (*Homo sapiens*)
www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=7069 (12.11.2011)
29. Gene cards
www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id_type=hgnc&search=11800&id=11800
(12.11.2011)
30. Jump B. D, Narayan P, Towlet H, Oppenheimer J. H: Rapid effect of triiodothyronine on hepatic gene expression. The journal of biological chemistry 1984; 259: 2789.
31. Colbert CL, Kim CW, Moon YA, Henry L, Palnitkar M, McKean WB, Fitzgerald K, Deisenhofer J, Horton JD, Kwon HJ: Crystal structure of Spot14, a modulator of fatty acid synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107 (44): 18820-18825.
32. Cunningham BA, Maloney M, Kinlaw WB: Spot 14 protein – Protein interactions: Evidence for both mono- and heterodimer formation *in vivo*. Endocrinology 1997; 138 (12): 5184-8.
33. Brown SB, Maloney M, Kinlaw WB: »Spot14« protein functions at the pretranslational level in the regulation of hepatic metabolism by thyroid hormone and glucose. The journal of biological chemistry 1997; 272: 2163-66.

34. Donnelly C, Olsen AM, Lewis LD, Eisenberg BL, Eastman A, Kinlaw WB: Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits expression of the Spot14 (THRSP) and fatty acid synthase genes and impairs the liposarcoma cells. *Nutr Cancer* 2009; 61 (1): 114-122.
35. Breuker C, Moreau A, Lakhal L, Tomasi V, Parmentier Y, Meyer U, Maurel P, Lumbroso S, Vilarem MJ, Pascussi JM: Hepatic expression of thyroid hormone-responsive Spot14 protein is regulated by constitutive androstane receptor (NR1/3). *Endocrinology* 2010; 151 (4): 1653-61.
36. Pregnane X receptor.
En.wikipedia.org/wiki/Pregnane_X_receptor (12.11.2011)
37. Constitutive androstane receptor.
En.wikipedia.org/wiki/Constitutive_androstane_receptor (12.11.2011)
38. Mater MK, Thelen AP, Pan DA, Jump DB: Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *The journal of biological chemistry* 1999; 274 (46): 32725-32.
39. Moncur JT, Park JP, Memoli VA, Mohandas TK, Kinlaw WB. The »Spot 14« gene resides on the telomeric end of the 11q13 amplicon and is expressed in lipogenic breast cancers: Implications for control of tumor metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (12): 6989-94.
40. Semenou D, Coeugnet E, Segard M, Martinot-Dugennoy v; Delaporte E: Launois-Bensaude's disease: report of 17 cases. *Ann Chir Plast Esthet* 2008; 53 (5): 399-407.
41. Grillasca JP, Gastaldi M, Khiri H, Dace A, Peyrol N, Reynier P, Torresani J, Planells R: Cloning and initial characterization of human and mouse Spot 14 genes: *FEBS Letters* 1997; 401 (1): 38-42.

42. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK in sod.: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, France: IARC Press; 2004.
43. Gruden K, Herzog-Velikonja B: Praktikum iz molekularne biologije - teoretični del. 2000; 106.
44. Invitrogen. Real-Time PCR from theory to practice. Carlsbad 2008; 37.
45. Wang Y, Zhu W, Levy DE: Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR Green based real-time RT-PCR Methods 2006; 39 (4): 356-362.
46. <http://www.rt-pcr.com> (17.12.2011)
47. Valasek MA, Repa JJ: The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education 2005; 29: 151-159.
48. Ginzinger DG.: Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Experimental Haematology 2002; 30:503-12.
49. Mackay IM: Real-time PCR in microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection 2004; 10: 190-212.
50. http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx (17.12.2011)
51. Applied Biosystems 2008. TaqMann RT-PCR assay. Leiden, ServiceXS.
52. Kinlaw WB, Quinn JL, Wells WA, Roser-Jones C, Moncur JT: Minireview: Spot 14: A marker of aggressive breast cancer and a potential therapeutic target. Endocrinology 2006; 147 (9): 4048-4055.

53. Wells AW, Schwartz NG, Morganelli MP, Cole FB, Gibson JJ, Kinlaw BW: Expression of »Spot 14« (THRSP) predict disease free survival in invasive breast cancer: immunohistochemical analysis of a new molecular marker. Breast Cancer Research and Treatment 2006; 98 (2): 231-240.
54. Marra A, Richardsen G, Wagner W, Muller-Tidow C, Koch OM, Hillejan L: Prognostic factors of resected node-positive lung cancer: Location, extent of nodal metastases, and multimodal treatment. Thorac Surg Sci. 2011; 3205-21.
55. Drobne M, Ciceniene A, Želviene PT, Grigiene R, Lachej N, Streponavičiene L, Aleknavičius E: Targeted therapy in patients with non-small cell lung cancer previously treated with chemotherapy. Medicina (Kaunas) 2011; 47 (9): 520-5.
56. Kinlaw III, William B.: Prognosis and treatment of breast cancer. United States Patent 7906294 2011; 11/912413.