

Adrianna Drozdowska

**Kliniczne znaczenie polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1*
u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP)**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. med. Ewa Jassem

Praca wykonana w ramach:

1. Grantu promotorskiego Komitetu Badań Naukowych - nr 2 P05C 048 27
2. Pracy statutowej Akademii Medycznej w Gdańsku - ST-23
3. Pracy własnej Akademii Medycznej w Gdańsku - W-198

Gdańsk 2008



Przestrzenna struktura 8-oxoguaninowej glikozylazy DNA1 (hOGG1)

(<http://www.cmbn.no/rognes/>)



Przestrzenna struktura białka Mdm2
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Mdm2>)

SPIS TREŚCI

| | |
|---|-----------|
| 1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I TERMINÓW | 8 |
| 2. WSTĘP | 11 |
| 2.1. Rak płuca | 11 |
| 2.2. Gen <i>hOGG1</i> | 14 |
| 2.2.1. Budowa genu | 14 |
| 2.2.2. Białkowy produkt genu <i>hOGG1</i> - 8-oksyguaninowa glikozylaza DNA 1 | 15 |
| 2.2.3. Polimorfizmy genu <i>hOGG1</i> | 19 |
| 2.3. Gen <i>MDM2</i> | 20 |
| 2.3.1. Budowa genu | 20 |
| 2.3.2. Białkowy produkt genu <i>MDM2</i> | 21 |
| 2.3.3. Polimorfizm SNP309 genu <i>MDM2</i> | 23 |
| 2.4. Gen <i>TP53</i> | 24 |
| 2.4.1. Budowa genu | 24 |
| 2.4.2. Białkowy produkt genu <i>TP53</i> - białko p53 | 24 |
| 2.5. Uzasadnienie podjęcia badań | 25 |
| 3. CELE PRACY | 27 |
| 4. MATERIAŁ | 28 |
| 4.1. Informacje ogólne | 28 |
| 4.2. Charakterystyka chorych na NDRP i osób z grupy kontrolnej | 29 |
| 5. METODY | 32 |
| 5.1. Informacje ogólne | 32 |
| 5.2. Izolacja DNA | 32 |
| 5.3. Oznaczanie stężenia DNA | 32 |
| 5.4. Metody badania polimorfizmu Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 5.4.1. ASA-PCR | 33 |
| 5.4.2. <i>Nested</i> PCR | 38 |
| 5.4.3. Sekwencjonowanie produktów PCR | 43 |
| 5.5. Metody badania polimorfizmu SNP309 genu <i>MDM2</i> | 45 |
| 5.5.1. RFLP | 45 |
| 5.6. Metody badania mutacji genu <i>TP53</i> | 49 |
| 5.7. Metody analizy statystycznej | 49 |
| 6. WYNIKI | 51 |
| 6.1. Polimorfizm Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> | 51 |
| 6.1.1. Częstość występowania wariantów polimorficznych Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> u chorych na NDRP i w grupie kontrolnej | 51 |
| 6.1.2. Polimorfizm Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP | 52 |
| 6.1.3. Kliniczna wartość polimorfizmu Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> u chorych na NDRP | 53 |
| 6.1.4. Rokownicza wartość polimorfizmu Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> u chorych na NDRP | 55 |
| 6.1.5. Zależność pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> i mutacji w genie <i>TP53</i> | 60 |
| 6.2. Polimorfizm SNP309 genu <i>MDM2</i> | 61 |
| 6.2.1. Częstość występowania wariantów polimorficznych SNP309 genu <i>MDM2</i> u chorych na NDRP i w grupie kontrolnej | 61 |
| 6.2.2. Polimorfizm SNP309 genu <i>MDM2</i> w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP | 62 |
| 6.2.3. Kliniczna wartość polimorfizmu SNP309 genu <i>MDM2</i> u chorych na NDRP | 63 |

| | |
|---|-----------|
| 6.2.4. Rokownicza wartość polimorfizmu SNP309 genu <i>MDM2</i> u chorych na NDRP | 65 |
| 6.2.5. Zależność pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych SNP309 genu <i>MDM2</i> i mutacji w genie <i>TP53</i> | 69 |
| 6.3. Współwystępowanie polimorfizmów Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> i SNP309 genu <i>MDM2</i> w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP | 69 |
| 7. Dyskusja | 72 |
| 7.1. Polimorfizm Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> | 72 |
| 7.1.1. Częstość występowania wariantów polimorficznych Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> u chorych na NDRP i w grupie kontrolnej | 72 |
| 7.1.2. Polimorfizm Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP | 75 |
| 7.1.3. Kliniczna wartość polimorfizmu Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> u chorych na NDRP | 82 |
| 7.1.4. Rokownicza wartość polimorfizmu Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> u chorych na NDRP | 83 |
| 7.1.5. Zależność pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> i mutacji w genie <i>TP53</i> | 83 |
| 7.2. Polimorfizm SNP309 genu <i>MDM2</i> | 85 |
| 7.2.1. Częstość występowania wariantów polimorficznych SNP309 genu <i>MDM2</i> u chorych na NDRP i w grupie kontrolnej | 85 |
| 7.2.2. Polimorfizm SNP309 genu <i>MDM2</i> w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP | 88 |
| 7.2.3. Kliniczna wartość polimorfizmu SNP309 genu <i>MDM2</i> u chorych na NDRP | 93 |

| | |
|---|------------|
| 7.2.4. Rokownicza wartość polimorfizmu SNP309 genu <i>MDM2</i> u chorych na NDRP | 94 |
| 7.2.5. Zależność pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych SNP309 genu <i>MDM2</i> i mutacji w genie <i>TP53</i> | 95 |
| 7.3. Współwystępowanie polimorfizmów Ser326Cys genu <i>hOGG1</i> i SNP309 genu <i>MDM2</i> w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP | 96 |
| 8. PODSUMOWANIE | 97 |
| 9. WNIOSKI | 98 |
| 10. STRESZCZENIE | 99 |
| 11. SPIS TABEL | 101 |
| 12. SPIS RYCIN | 104 |
| 13. PIŚMIENNICTWO | 106 |

1. INDEKS STOSOWANYCH SKRÓTÓW I TERMINÓW

| | |
|--------------------|---|
| A | adenina |
| Aa | aminokwas |
| AC | gruczolakorak (<i>ang. adenocarcinoma</i>) |
| Ala | alanina |
| Allele | jedna z wersji genu w określonym miejscu (locus) na danym chromosomie homologicznym |
| Ang. | z języka angielskiego |
| Arg | arginina |
| ASA-PCR | reakcja łańcuchowa polimerazy z wykorzystaniem starterów specyficznych dla allelu (<i>ang. allele specific amplification - polymerase chain reaction</i>) |
| Asn | aspargina |
| Asp | kwasy asparaginowy |
| BER | naprawa uszkodzonego DNA przez wycinanie zasady (<i>ang. base-excision repair</i>) |
| C | cytozyna |
| CI | przedział ufności |
| Cys | cysteina |
| cDNA | (komplementarny DNA, <i>ang. complementary DNA</i>) — DNA uzyskany poprzez odwrotną transkrypcję na matrycy mRNA |
| ddH ₂ O | woda podwójnie destylowana |
| DNA | kwasy deoksyrybonukleinowy (<i>ang. deoxyribonucleic acid</i>) |
| dNTP | trójfosforan deoksyrybonukleozydu (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) |
| EDTA | kwasy etylenodwuminocztwooctowy |
| G | guanina |
| G1-G3 | stopień zróżnicowania histopatologicznego |
| Gln | glutamina |
| Heterozygota | organizm posiadający dwa różne allele danego genu |

| | |
|-------------------|--|
| Homozygota | organizm posiadający dwa identyczne allele danego genu |
| HR | współczynnik ryzyka (<i>ang. hazard ratio</i>) |
| LCC | rak wielkokomórkowy (<i>ang. large cell carcinoma</i>) |
| Locus | lokalizacja genu na chromosomie |
| mRNA | informacyjny (matrycowy) RNA |
| N | liczba przypadków |
| NDRP | niedrobnokomórkowy rak płuca (<i>ang. non-small cell lung cancer</i>) |
| NER | naprawa uszkodzonego DNA przez wycinanie nukleotydu (<i>ang. nucleotide-excision repair</i>) |
| <i>Nested</i> PCR | reakcja łańcuchowa polimerazy z produktu PCR |
| OR | współczynnik ryzyka (<i>ang. odds ratio</i>) |
| OS | całkowite przeżycie (<i>ang. overall survival</i>) |
| Paczkolata | liczba paczek papierosów wypalonych dziennie x lata palenia |
| P | poziom istotności statystycznej |
| PCR | reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>ang. polymerase chain reaction</i>) |
| pTNM | stopień zaawansowania nowotworu oceniony przez patologa |
| pz | jednostka długości łańcucha DNA (pary zasad, <i>ang. bp, base pair</i>) |
| RFLP | polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (<i>ang. restriction fragments length polymorphism</i>) |
| RNA | kwas rybonukleinowy (<i>ang. ribonucleic acid</i>) |
| ROS | reaktywne formy tlenu (<i>ang. reactive oxygen species</i>) |
| SCC | rak płaskonabłonkowy (<i>ang. squamous cell carcinoma</i>) |
| Ser | seryna |
| SNP | polimorfizm pojedynczego nukleotydu (<i>ang. single nucleotide polymorphism</i>) |

| | |
|---------|---|
| SSCP | polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (<i>ang. single strand conformation polymorphism</i>) |
| T | tymina |
| Taq | termostabilna polimeraza DNA (<i>łac. Thermus aquaticus</i>) |
| TNM | klasyfikacja zaawansowania raka (<i>ang. T-tumor, N-nodulus, M-metastasis</i>) |
| UICC | Miedzynarodowa Unia do Walki z Rakiem (<i>fr. Union Internationale Contre le Cancer</i>) |
| UV | promieniowanie ultrafioletowe |
| vs | <i>versus</i> |
| 8- oxoG | 8-oksoguanina |

Wielkości fizyczne

| | |
|------|--|
| µg | mikrogram |
| µl | mikrolitr |
| Da | Dalton |
| g | gram |
| kb | (kilo par zasad) 1 kbp = 1,000 pz |
| kDa | (kilodalton) 1 kDa = 1000 Da |
| ng | nanogram |
| nm | nanometr |
| min | minuta |
| ml | mililitr |
| M | mol |
| mM | milimol |
| pmol | pikomol |
| U | jednostka enzymu (<i>ang. unit</i>) |
| °C | stopień Celcjusza |
| V | wolt |
| W | wat |
| pz | pary zasad (<i>ang. bp, base pair</i>) |

2. WSTĘP

2.1. Rak płuca

Rak płuca jest najczęstszym nowotworem złośliwym w Polsce i na świecie (100). Ze względu na częstość występowania oraz poważne rokowanie guz ten stanowi jeden z najważniejszych problemów medycznych i społecznych.

Liczba zachorowań na raka płuca w Polsce w 2005 roku wynosiła ponad 20 000. Rak płuca występuje trzykrotnie częściej u mężczyzn niż u kobiet, a standaryzowany współczynnik zachorowań na ten nowotwór w tym samym roku wynosił 60,0 na 100 000 mężczyzn i 14,4 na 100 000 kobiet. Rak płuca jest najczęstszym nowotworem złośliwym u mężczyzn i stanowi 23,9% wszystkich nowotworów złośliwych. U kobiet rak płuca zajmuje drugie miejsce pod względem zachorowalności, po raku piersi i stanowi 7,8% wszystkich nowotworów złośliwych. W ciągu ostatnich kilku lat, w wielu krajach, w tym także w Polsce, obserwuje się zahamowanie wzrostu zachorowań na raka płuca, ale trend ten dotyczy wyłącznie mężczyzn. U kobiet natomiast nastąpił istotny wzrost zachorowań. Największa liczba zachorowań na raka płuca przypada na 6-7 dekadę życia (33).

Udokumentowanym czynnikiem etiologicznym raka płuca jest palenie tytoniu (38). Epidemiologiczne i doświadczalne badania potwierdzają bezpośredni związek pomiędzy ekspozycją na składniki dymu tytoniowego i kancerogenezą w obrębie nabłonka błony śluzowej oskrzeli. Szacuje się, że 90% zachorowań na raka płuca jest skutkiem czynnego palenia tytoniu (38), a bierne palenie jest przyczyną 1/3 zachorowań na ten guz u osób niepalących (4,7).

Udokumentowane znaczenie w etiologii raka płuca ma także narażenie na czynniki zawodowe lub wynikające z zanieczyszczenia środowiska. Dotyczy to takich kancerogennych substancji jak radon, azbest, metale ciężkie czy promieniowanie jonizujące (7, 22, 88). Wykazano, że

niektóre spośród nich mogą działać synergistycznie ze szkodliwymi substancjami zawartymi w dymie tytoniowym (7, 28).

Obecnie obowiązujący podział pierwotnych raków płuca, na dwie grupy (rak drobno- i niedrobnokomórkowy) jest związany z różnym przebiegiem klinicznym, rokowaniem i metodami leczenia.

Rak drobnokomórkowy, stanowiący 20% ogółu raków płuca, jest guzem o szczególnie złośliwym przebiegu. Charakteryzuje się szybkim wzrostem, skłonnością do wczesnego tworzenia przerzutów oraz znaczną podatnością na chemioterapię, która stanowi podstawową metodę leczenia.

Raki niedrobnokomórkowe stanowią 80% nowotworów złośliwych płuca. Do tej grupy zalicza się: raka płaskonabłonkowego, gruczolakoraka, raka wielkokomórkowego i guzy mieszane (19). Rak płaskonabłonkowy stanowi około 40% wszystkich pierwotnych nowotworów płuca. Jest najsilniej wśród raków niedrobnokomórkowych związany z narażeniem na dym tytoniowy. Występuje znacznie częściej u mężczyzn niż u kobiet (121, 122). Gruczolakorak jest drugim pod względem częstości występowania nowotworem pierwotnym płuc i stanowi około 30% przypadków. W niektórych krajach stwierdza się w ostatnich latach stopniowy wzrost odsetka tego nowotworu. Gruczolakorak częściej występuje u kobiet. Charakteryzuje się skłonnością do naciekania naczyń krwionośnych i wczesnym tworzeniem przerzutów. Rak wielkokomórkowy – najrzadszy spośród pierwotnych raków płuca – stanowi około 10% przypadków. Jego lokalizacja i przebieg kliniczny są zróżnicowane.

Nadal nie ma skutecznych badań przesiewowych w kierunku raka płuca. Z powodu dużego zaawansowania choroby w chwili rozpoznania do radykalnego leczenia kwalifikuje się jedynie 15% chorych na NDRP. Doszczętna resekcja miąższu płucnego jest metodą z wyboru, gdy zaawansowanie nowotworu nie przekracza stopnia IIIA. U wybranych chorych z tej grupy stosuje się pooperacyjną chemioterapię. Chorzy w stopniu III tworzą bardzo niejednorodną grupę, w której wybór metody leczenia jest wciąż kontrowersyjny. W zależności od klinicznych cech guza stosuje się w

tej grupie leczenie operacyjne (ewentualnie poprzedzone chemioterapią) lub radioterapię lub radiochemioterapię. U chorych z bardzo zaawansowaną chorobą (stopień IV) stosuje się chemioterapię lub leczenie objawowe.

Rak płuca należy do nowotworów o poważnym rokowaniu. Odsetek 5-letnich przeżyć chorych na NDRP wynosi ogółem 8%. Najważniejszymi czynnikami rokowniczymi NDRP są: wyjściowe zaawansowanie nowotworu, stan sprawności oraz ubytek masy ciała. Nadal kontrowersyjna pozostaje rokownicza wartość rozpoznania histopatologicznego i stopnia zróżnicowania komórek nowotworowych guza (51, 72, 97).

W ostatnim dziesięcioleciu coraz większą uwagę zwraca się na rolę innych, niż parametry kliniczne, czynników rokowniczych. W wielu pracach wykazano, że zarówno zmiany na poziomie molekularnym w komórkach guza, jaki i lokalna odpowiedź immunologiczna, mogą mieć znaczenie prognostyczne (72). Wydaje się, że gorsze rokowanie u chorych na NDRP, może być związane z uszkodzeniami niektórych genów supresorowych i protoonkogenów, a w szczególności genu *TP53*, *K-ras* czy *C-erbB-2/HER-2/neu* (42, 81, 89, 106). Są prace, w których wykazano, że polimorfizm genowy, czyli naturalna zmienność DNA, genów supresorowych może również mieć wpływ na rokowanie (126). W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się na wyodrębnienie takich cech biologicznych nowotworu, które warunkowałyby jego większą podatność na chemioterapię lub napromienianie. Określenie tych cech umożliwi z kolei wyodrębnienie grupy chorych na NDRP, u których odpowiednio dobrane leczenie uzupełniające przyniesie największe korzyści.

W ostatnich latach coraz większą rolę w etiopatogenezie raka płuca przypisuje się predyspozycji genetycznej. Zwrócono uwagę, że ryzyko zachorowania na raka płuca u osób spokrewnionych z chorymi na ten guz jest nieco wyższe niż u pozostałych (96, 110). Dotychczasowe badania genetyczne pozwalają przypuszczać, że zwiększone ryzyko zachorowania może być spowodowane polimorfizmem genowym w obrębie genów metabolizujących ksenobiotyki, genów naprawczych oraz genów ważnych dla podstawowych

czynności komórki, takich jak proliferacja, wzrost i różnicowanie lub zdolność do apoptozy (45, 47, 68, 113).

2.2. Gen *hOGG1*

2.2.1. Budowa genu

Gen *hOGG1* należy do grupy genów kodujących białka zdolne do rozpoznawania i naprawy uszkodzeń w obrębie nici DNA. Jest zlokalizowany na krótszym ramieniu chromosomu 3, w *locus* 3p25-26 (8, 62, 105). W genie *hOGG1* wyróżnia się pięć regionów konserwowanych ewolucyjnie. Sekwencje występujące w tych domenach wykazują dużą homologię u odległych systematycznie gatunków. W dwóch spośród tych regionów znajduje się sekwencja kodująca miejsce aktywne Helix-hairpin-helix-K/PDV (14).

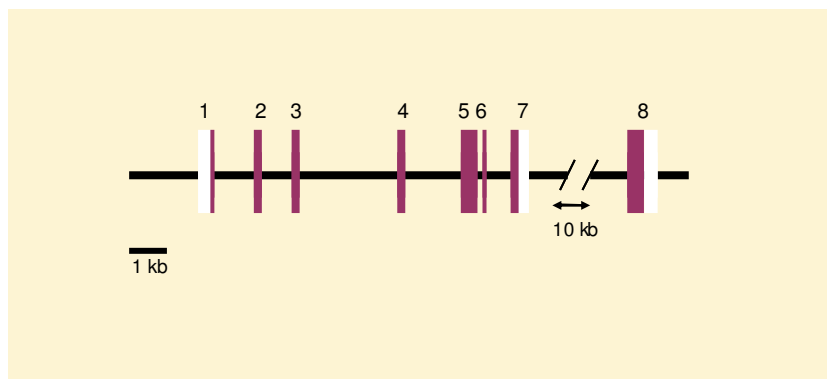
„Alternatywne składanie” regionu C-końcowego genu *hOGG1* pozwala wyodrębnić dwie główne grupy „splice variants”, typ α i typ β , różniące się ostatnim egzonem w sekwencji. W przypadku α -*hOGG1* transkrybowany region obejmuje mniej niż 7 kb sekwencji genomu i ma siedem egzonów. Pierwsza część (6 egzonów β -*hOGG1*) jest identyczna jak w typie α , a siódmy egzon, w wyniku alternatywnego składania, jest zastąpiony przez 8 egzon zlokalizowany w odległości 8 kb za ostatnim (siódmym) egzonem w typie α . (14). Opisano wiele alternatywnych wariantów składania dla tego genu, ale ich szczegółowa sekwencja nie została w pełni poznana.

Odcinek N-końcowy genu *hOGG1* zawiera miejsce celowane dla sygnału z mitochondriów, kluczowego dla lokalizacji mitochondrialnej. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=4968)

Rycina 1. Struktura genu *hOGG1*

Białe prostokąty w egzonach 1, 7 i 8 reprezentują odpowiednio 5' i 3' regiony mRNA nie podlegające translacji

(na podstawie pozycji piśmiennictwa 14)



2.2.2. Białkowy produkt genu *hOGG1* – 8-oksyguaninowa glikozylaza DNA 1

Na podstawie analizy sekwencji cDNA wykazano, że istnieją dwa rodzaje mRNA z otwartymi ramkami odczytu kodującymi peptydy o wielkości 345 aa (38 780 Da) i 424 aa (47 kDa), odpowiednio α -hOGG1 i β -hOGG1. Oba te białka mają wspólny N-końcowy odcinek złożony z 316 aa. Pierwsze 30 aminokwasów w tym regionie jest przypuszczalnie miejscem celowanym dla sygnału z mitochondriów. Oba białka w istotny sposób różnią się C-końcowym regionem. α -hOGG1 wykazuje silne podobieństwo z yOGG1 (*Saccharomyces cerevisiae*) (37% całkowitej identyczności z sekwencją aminokwasów yOGG1), w szczególności homologiczna jest sekwencja dla lokalizacji w jądrze oraz sekwencja kodująca miejsce aktywne HhH-G/PD. Ostatnie 29 aminokwasów występujące w formie α , jest zastąpione w formie β przez odcinek składający się ze 108 aminokwasów. Ta zmiana powoduje usunięcie wysoce konserwatywnej sekwencji odpowiedzialnej za lokalizację w jądrze komórkowym. Doświadczalnie wykazano, że forma α -hOGG1 występuje prawie wyłącznie w jądrze komórkowym, natomiast β -hOGG1 w błonie wewnętrznej mitochondrium. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa obu

form hOGG1 pozwala przypuszczać, że w przypadku izofomy alfa mitochondrialny sygnał docelowy jest przekazywany z nadmierną częstotliwością przez sekwencję lokalizacji jądrowej – NLS (*ang. Nuclear Localization Signal*) (14, 90, 117).

Rycina 2. Warianty składowania pierwotnego transkryptu *hOGG1*.

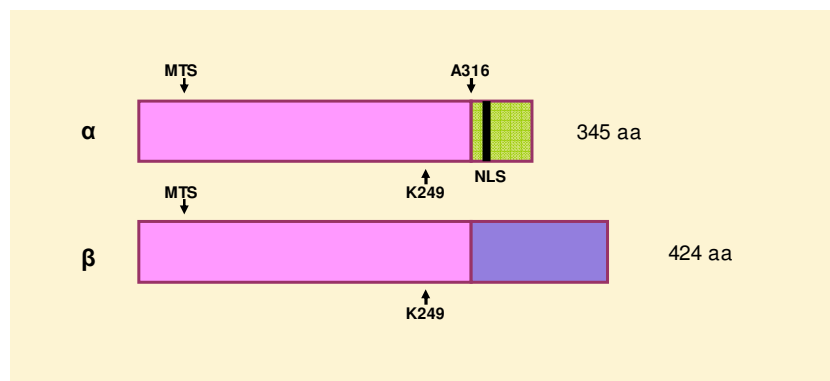
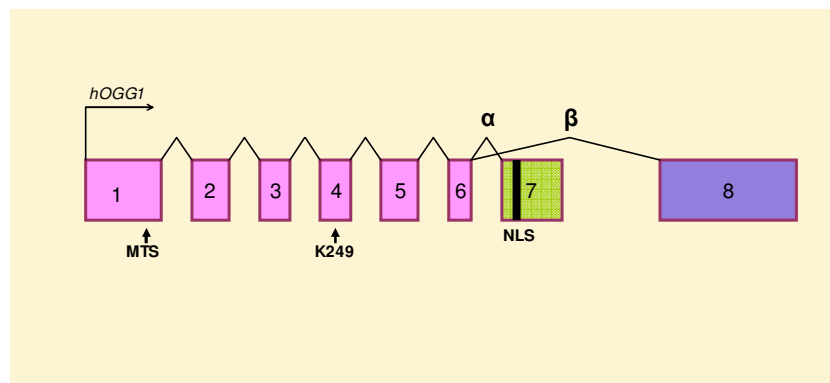
Strzałki wskazują kierunek transkrypcji genu *hOGG1*. MTS-przypuszczalny sygnał celowany mitochondrialny, NLS-sekwencja lokalizacji jądrowej.

Izofomy alfa i beta hOGG1 składają się odpowiednio z 345 i 424 aa.

K249 – lizyna odgrywająca rolę katalizatora

A316 – alanina (ostatni aminokwas wspólny dla izoform alfa i beta)

(na podstawie pozycji piśmiennictwa 14)



8-oksoguaninowa glikozylaza DNA 1 - hOGG1 (*ang. 8-oxoguanine-DNA glycosylase 1*) należy do grupy enzymów naprawiających uszkodzone DNA poprzez wycięcie zasady (*ang. base excision repair - BER*). O

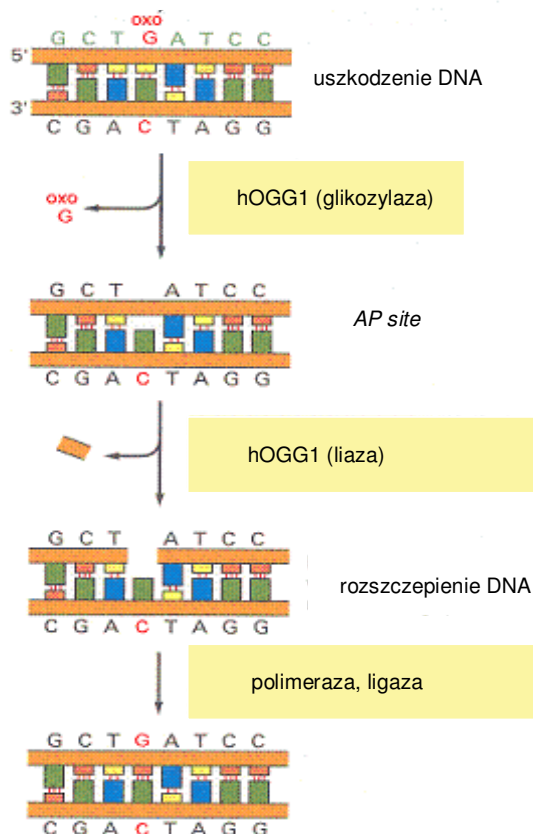
przynależności do nadrodziny BER decyduje obecność w sekwencji aminokwasów motywu „spinki do włosów” HhH-G/PD (Helix – hairpin – Helix, Gly/Pro-rich-Asp motif) składającego się z 30 aminokwasów. Miejsce to jest konserwowane ewolucyjnie i aktywne dla wszystkich enzymów należących do nadrodziny BER. Na C-końcowym odcinku motywu HhH-G/PD znajduje się aspargina, która pełni kluczową rolę w katalizowaniu rozszczepienia wiązania glikozylowego pomiędzy uszkodzoną zasadą a cukrem we wszystkich glikozylazach należących do BER. W sekwencji aminokwasowej białka hOGG1 aspargina znajduje się w pozycji 268. Drugi, istotny aminokwas, który odgrywa kluczową rolę katalizatora to lizyna. Znajduje się ona w pozycji 249 i odpowiada za aktywność liazy białka hOGG1 (78, 105).

Białko hOGG1 rozpoznaje i usuwa 8-oksyguaninę (8-oxoG) z uszkodzonego DNA. 8-oxoG jest najczęstszym, wysoce mutagennym, uszkodzeniem DNA, które powstaje w wyniku działania reaktywnych form tlenu (*ang. reactive oxygen species – ROS*) zawartych między innymi w dymie tytoniowym. 8-oxoG łączy się podczas replikacji z cytozyną lub nieprawidłowo z adeniną. Adenina łączy się w kolejnej replikacji z tyminą, co prowadzi w konsekwencji do transwersji pary guanina – cytozyna na parę tymina – adenina (25, 133). Zwiększone stężenie 8-oxyguaniny stwierdzono w DNA wyizolowanym z obwodowych leukocytów i z mięszu płucnego u nałogowych palaczy i u chorych na raka płuca (10, 11, 43, 61).

hOGG1 jest głównym enzymem rozpoznającym i naprawiającym to uszkodzenie DNA. Enzym ten „skanuje” nić DNA, wyszukując nieprawidłowe zasady. hOGG1 rozpoznaje 8-oxoG, ponieważ atom N7 w jej cząsteczce jest w stanie protonacji (w odróżnieniu do cząsteczki guaniny) (40). W miejscu niestabilności nici DNA spowodowanej obecnością 8-oxyguaniny, glikozylaza powoduje powstanie pętli DNA, a następnie „wyciąga” na zewnątrz helisy nieprawidłową zasadę i wbudowuje ją do swego centrum aktywnego (31). Następnie katalizuje rozerwanie wiązania glikozylowego pomiędzy 8-oxoG i deoksyrybozą, powodując odłączenie

uszkodzonej zasady od cząsteczki DNA. W konsekwencji powstaje miejsce nie zawierające zasady (*ang. AP site*). hOGG1 dzięki posiadaniu aktywności wewnętrznej o właściwościach liazy, powoduje rozszczepienie DNA w tym miejscu. Następnie inne enzymy należące do systemu BER (dRPasa/polimeraza beta, ligaza) powodują włączenie prawidłowej cząsteczki guaniny, w miejscu wyciętej 8-oxoG (31, 40, 41, 80) Udowodniono, że hOGG1 ma największą swoistość i aktywność dla 8-oxoG połączonej z cytozyną (66). Obecność tyminy naprzeciwko 8-oxoG, istotnie obniża aktywność hOGG1. Natomiast w połączeniach 8-oxoG z adeniną czy guaniną hOGG1 jest prawie zupełnie nieaktywna. Odnosi się to zarówno do glikozylazowej, jak i liazowej aktywności hOGG1 (14, 105).

Rycina 3. hOGG1 - naprawa uszkodzonego DNA przez wycinanie zasady BER



Białko hOGG1 ulega ekspresji w różnych tkankach, największe jego ilości stwierdzono w mózgu. Duża ekspresja występuje również w płucach, nerkach, grasicy, jądrach i jajnikach (90).

2.2.3. Polimorfizmy genu *hOGG1*

Polimorfizmem genetycznym określa się występowanie w populacji dwóch lub więcej alleli w danym *locus* z częstotliwością większą niż wynikająca z ogólnej częstotliwości mutacji. O polimorfizmie mówimy wtedy, gdy najczęstszy allel w danym *locus* występuje z częstotliwością mniejszą niż 99%. Polimorfizm może występować w egzonach (regiony kodujące) lub intronach (regiony niekodujące).

Dotychczas opisano kilkanaście polimorfizmów w genie *hOGG1*. Wszystkie są zebrane w internetowej bazie danych *National Center of Biotechnology Information (NCBI)* (www.ncbi.nlm.nih.gov) i *ENSEMBL* (www.ensembl.org). Cztery spośród nich zlokalizowane są w egzonach genu *hOGG1* (egzon 2, 4 i 7) i powodują zmianę sekwencji aminokwasów (tabela 1).

Tabela 1. Polimorfizmy genu *hOGG1* zlokalizowane w egzonach

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=4968)

| Region | Zasada | Aminokwas | Pozycja w kodonie | Pozycja aminokwasu |
|---------|--------|-----------|-------------------|--------------------|
| egzon_2 | T | Ser [S] | 1 | 85 |
| | G | Ala [A] | 1 | 85 |
| egzon_4 | A | Gln [Q] | 2 | 229 |
| | G | Arg [R] | 2 | 229 |
| egzon_7 | A | Asn [N] | 1 | 322 |
| | G | Asp [D] | 1 | 322 |
| | G | Cys [C] | 2 | 326 |
| | C | Ser [S] | 2 | 326 |

Najlepiej poznany polimorfizm występuje w kodonie 326 egzonu 7 (Ser326Cys). W pozycji drugiej tego kodonu może występować cytozyna lub guanina. Białkowe produkty genu w zależności od wariantu polimorficznego różnią się obecnością seryny (Ser – kodon TCC) lub cysteiny (Cys - TGC) (rycina 4).

Rycina 4 . Fragment sekwencji genu *hOGG1* - polimorfizm w kodonie 326

Fragment sekwencji genu *hOGG1* zawierającej kodon serynowy

5'- CTG CGC CAA TCC CGC CAT GCT CAG -3'

Fragment sekwencji genu *hOGG1* zawierającej kodon cysteinowy

5'- CTG CGC CAA TGC CGC CAT GCT CAG -3'

Ostatnie badania wskazują, że wariant polimorficzny, w którym występuje cysteina wykazuje obniżoną aktywność naprawczą wobec 8-oxoG (136) i jest związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju NDRP, zwłaszcza u długoletnich palaczy (98).

2.3. Gen *MDM2*

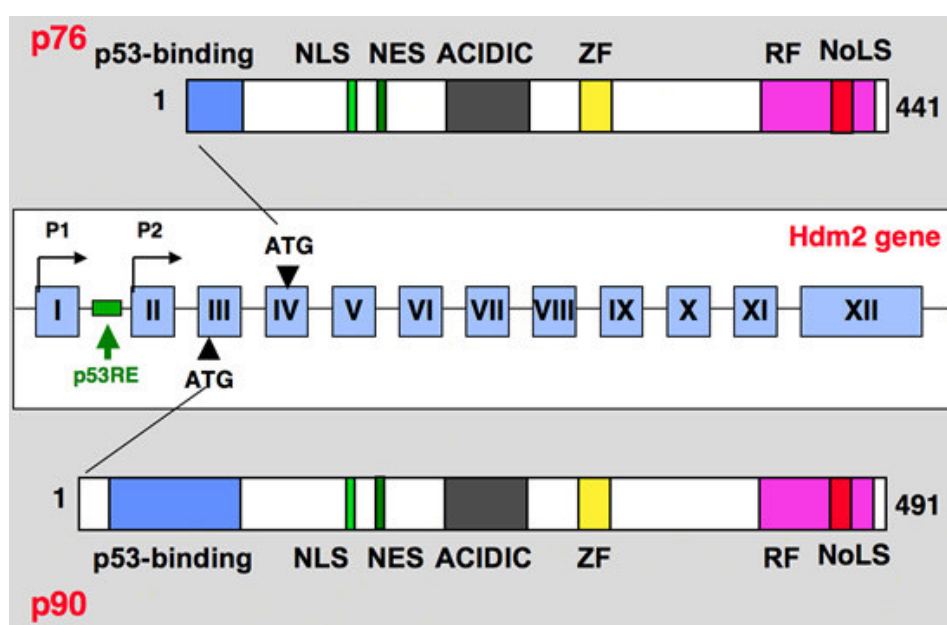
2.3.1. Budowa genu

Gen *MDM2* (*Murine double minute 2*, lub *HDM2* – *Human double minute 2*) jest zlokalizowany w chromosomie 12q14.3-q15 (84). Zawiera 12 egzonów obejmujących 25 kb DNA (64, 91). Gen *MDM2* zawiera dwa regiony promotorowe, drugi z nich reguluje czynność p53.

Gen *MDM2* jest zaliczany do protoonkogenów, a jego aktywność „pronowotworowa” ujawnia się przede wszystkim w przypadku jego nadekspresji i zwiększonej produkcji kodowanego przez niego białka (86).

Rycina 5. Budowa genu *MDM2* i kodowanych przez niego białek p76Mdm2 i p90Mdm2

Dwa promotory wskazano strzałkami. NLS-sygnal lokalizacji jądrowej; NES-sygnal eksportu jądrowego; *ZFr*-domena palców cynkowych; *NoLS*-sygnal lokalizacji jąderkowej; RF-domena *RING-finger*. Numery powyżej rysunków oznaczają numery aminokwasów, a numeracją rzymską oznaczono numery egzonów. (www.p53.free.fr)



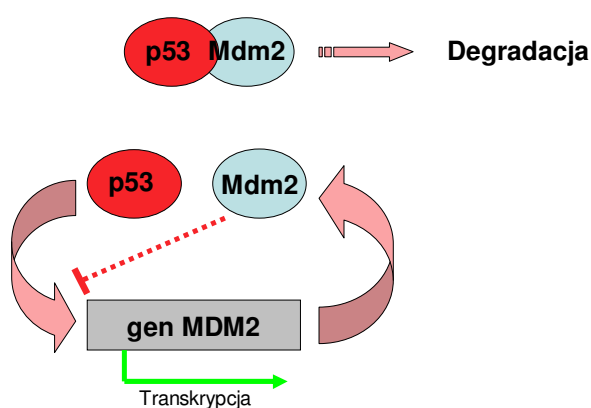
2.3.2. Białkowy produkt genu *MDM2*

Obecność dwóch regionów promotorowych w genie *MDM2*, umożliwia tworzenie dwóch białek, białka pełnej długości - p90Mdm2 i krótszego - p76Mdm2. Translacja białka p90Mdm2 rozpoczyna się od pierwszego kodonu inicjującego ATG w egzonie 3, a translacja krótszej formy - p76, zaczyna się od drugiego kodonu ATG w egzonie 4.

Białko p76Mdm2 nie zawiera części domeny wiążącej p53, pełni natomiast rolę głównego negatywnego inhibitora białka p90Mdm2 i aktywuje białko p53 (64).

Pełnej długości białko Mdm2 (p90Mdm2) ma masę cząsteczkową 90kDa. Białko to pełni kluczową rolę w procesie regulacji stężenia białka p53 w komórce. W zdrowych komórkach białko Mdm2 tworzy z białkiem p53 „nieczynny” kompleks, blokując jego aktywność transkrypcyjną i prowadząc do degradacji przez ubikwitynację (86) (rycina 6).

Rycina 6. Pętla sprzężenia zwrotnego p53-Mdm2
(na podstawie pozycji piśmiennictwa 86)



W przypadku, kiedy wzrasta ilość białka Mdm2 w komórce coraz większa ilość białka p53 jest blokowana w kompleksach, przez co traci ono zdolność do pełnienia swych funkcji. Wzrost ilości białka Mdm2 w komórce może nastąpić na drodze różnych mechanizmów, takich jak: amplifikacja genu *MDM2*, jego zwiększona transkrypcja oraz zwiększona translacja białka Mdm2.

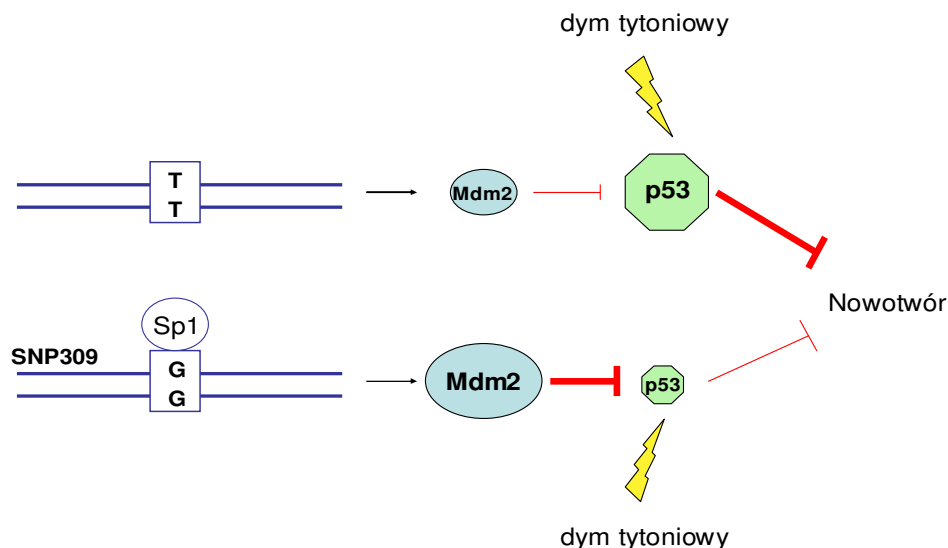
Ostatnie badania wskazują, że nadekspresja lub amplifikacja genu *MDM2* często występuje w wielu nowotworach o różnej lokalizacji, w tym raku płuca (35, 39, 85, 93).

2.3.3. Polimorfizm SNP309 genu *MDM2*

W ostatnich latach został opisany polimorfizm w regionie promotorowym genu *MDM2* oznaczany jako SNP309 (16, 17). W pozycji 309 pierwszego intronu może występować tymina lub guanina. Wykazano, że obecność wariantu homologicznego guanina-guanina (GG) jest związana ze zwiększoną aktywnością transkrypcyjnego aktywatora Sp1 powodując wzrost ilości mRNA-MDM2 oraz białka Mdm2. To z kolei prowadzi do zwiększonego blokowania białka p53 w kompleksach z białkiem Mdm2 (9, 16, 17). W rezultacie białko p53 nie może spełniać swojej funkcji i w sytuacji „stresu” np. uszkodzenia DNA przez reaktywne formy tlenu zawarte w dymie tytoniowym nie sprowadza komórki na drogę apoptozy, co utrwała mutacje i może prowadzić do kancerogenezy (rycina 7).

Rycina 7. Związek pomiędzy polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* a powstaniem nowotworu

(na podstawie pozycji piśmiennictwa 17)



2.4. Gen *TP53*

2.4.1. Budowa genu

Gen *TP53*, zwany też „strażnikiem genomu”, jest genem supresorowym, a jego rola polega na utrzymaniu integralności genomu. Gen ten zlokalizowany jest na krótszym ramieniu chromosomu 17, w *locus* 17p13.1. Zawiera on 11 egzonów oraz dwa regiony promotorowe w egzonie 1. Alternatywne składanie występuje w intronie 2 oraz pomiędzy egzonami 9 i 10. Gen *TP53* zawiera także wewnętrzny region promotorowy oraz miejsce inicjacji transkrypcji w intronie 4 (18).

2.4.2. Białkowy produkt genu *TP53* – białko p53

Białko p53 jest fosfoproteina jądrową, zbudowaną z 393 aminokwasów (53kDa). Białko to zawiera pięć regionów, które odpowiadają za specyficzne funkcje. N-końcowy odcinek (1-42 aa) zawiera domenę aktywującą transkrypcję oraz miejsce wiążące białko Mdm2 (109). Następny region (40-92 aa) jest bogaty w prolinę i zawiera drugą domenę odpowiedzialną za aktywację transkrypcji (34). Środkowy region (101-306 aa) odpowiada za przyłączanie się białka do DNA (101). Domena oligomeryzacyjna (307-355 aa) zawiera łańcuch-beta oraz alfa-heliks, niezbędne do tworzenia dimerów i tetramerów przez białko p53 (24). Na C-końcowym odcinku (356-393 aa) znajduje się domena pełniąca funkcje regulatorowe oraz domena odpowiedzialna za przyłączanie białka do uszkodzonego DNA (140).

Białko p53 jest zaangażowane w mechanizmy regulacji cyklu komórkowego, naprawę uszkodzeń genomu, indukcję apoptozy, różnicowanie komórek oraz angiogenezę. Pełni rolę czynnika transkrypcyjnego i wiążąc się do specyficznych sekwencji DNA, w sposób wybiórczy aktywuje transkrypcję innych genów.

Istotną funkcją białka p53 jest naprawa uszkodzonego DNA i zapobieganie przekazaniu tego uszkodzenia komórkom potomnym. Jest to

możliwe dzięki zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie G1, co wydłuża czas potrzebny na naprawę DNA przed replikacją (2). Jeżeli jednak uszkodzenie jest zbyt duże, a naprawa nie jest możliwa, białko p53 kieruje komórkę na drogę apoptozy.

W zdrowych komórkach ilość białka p53 jest niska, a samo białko charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania (około 6-20 minut). Uważa się, że głównym regulatorem białka p53, odpowiadającym za utrzymanie jego niskiego stężenia w komórce, jest białko Mdm2 (5).

2.5. Uzasadnienie podjęcia badań

Palenie tytoniu jest główną przyczyną rozwoju raka płuca. W porównaniu do osób niepalących, palacze tytoniu mają 10-krotnie większe ryzyko zgonu z powodu raka płuca, a u nałogowych palaczy ryzyko to jest jeszcze większe (15-25 razy) (21). Pomimo tej ścisłej zależności pomiędzy paleniem tytoniu a rozwojem raka płuca, szacuje się, że tylko 11% spośród nałogowych palaczy tytoniu choruje na ten nowotwór (3). Pozwala to przypuszczać, że muszą istnieć inne czynniki warunkujące indywidualną podatność na kancerogenne działanie substancji zawartych w dymie tytoniowym.

Dotychczas nie opracowano skutecznych badań przesiewowych, pozwalających na wczesne wykrywanie raka płuca. Wydaje się natomiast, że określenie biologicznych cech, które warunkują większą „wrażliwość” na kancerogeny zawarte w dymie tytoniowym, umożliwiłoby wyodrębnienie populacji o szczególnie wysokim ryzyku zachorowania na ten nowotwór.

Dotychczasowe badania pozwalają przypuszczać, że zwiększone ryzyko zachorowania na NDRP u nałogowych palaczy tytoniu może być spowodowane polimorfizmem genowym w obrębie genów metabolizujących ksenobiotyki, genów ważnych dla podstawowych czynności komórki, takich jak proliferacja, wzrost i różnicowanie lub zdolność do apoptozy oraz genów naprawczych.

Ostatnie badania wskazują, że polimorfizmy Ser326Cys genu *hOGG1* oraz SNP309 genu *MDM2* mogą być związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju NDRP, zwłaszcza u nałogowych palaczy tytoniu (73, 75, 98, 137). Brak jednak szerszych danych dotyczących tego zagadnienia. Dotychczasowe analizy odnośnie polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* przeprowadzono głównie w grupach chorych z krajów Dalekiego Wschodu (63, 73, 114) i wśród amerykańskiej rasy białej (73, 98); niewiele jest publikacji dotyczących występowania tego polimorfizmu wśród ludności europejskiej (59, 129). Związek pomiędzy polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* i ryzykiem rozwoju NDRP oceniano dotychczas w pojedynczych analizach w populacji chińskiej (58, 137), koreańskiej (99), kaukaskiej (74, 75, 104) oraz wśród Afroamerykanów (104); nie ma żadnych badań tego typu w populacji polskiej.

W regionie północnej Polski odnotowuje się wysoką zachorowalność na raka płuca w skali kraju. W województwie pomorskim standaryzowany współczynnik zachorowań na raka płuca u mężczyzn jest najwyższy w odniesieniu do innych województw i stanowi 76,7, a u kobiet jest na drugim miejscu po województwie dolnośląskim i stanowi 19,3 (33). Zatem wydaje się celowe określenie częstości występowania wariantów polimorficznych genu *hOGG1* i genu *MDM2*, zarówno u chorych na NDRP, jak i u osób zdrowych z regionu województwa pomorskiego oraz znaczenia tych polimorfizmów w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP.

Drugim zagadnieniem omawianym w niniejszej pracy jest zależność pomiędzy występowaniem wymienionych wariantów polimorficznych i mutacji w genie *TP53*. Najprawdopodobniej obecność określonych wariantów polimorficznych związana jest z częstszym występowaniem uszkodzeń DNA w wyniku działania kancerogenów i powstawaniem mutacji, które kierują komórkę na drogę kancerogenezy. Podjęcie tego typu analizy jest istotnym uzupełnieniem pierwszej części pracy.

3. CELE PRACY

Celem pracy jest określenie znaczenia polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* i odniesienie uzyskanych wyników do polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* w NDRP.

Cele szczegółowe obejmują:

1. Określenie częstości występowania wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* oraz SNP309 genu *MDM2* u chorych na NDRP i w grupie kontrolnej
2. Określenie znaczenia polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* oraz polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP
3. Ocena wartości klinicznej polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* i polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* u chorych na NDRP
4. Ocena wartości rokowniczej polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* i polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* u chorych na NDRP
5. Ocena występowania polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* i polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* w odniesieniu do obecności mutacji w genie *TP53*
6. Ocena współwystępowania obu polimorfizmów i ich znaczenie w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP

4. MATERIAŁ

4.1. Informacje ogólne

Badaniem zostało objętych 142 chorych na NDRP operowanych w latach 1996-2000 w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej (Kierownik – prof. dr hab. Jan Skokowski, obecnie - dr hab. Witold Rzyman). Klasyfikację histopatologiczną i ocenę stopnia zaawansowania nowotworu przeprowadzono w Zakładzie Patomorfologii AMG (Kierownik – prof. dr hab. Andrzej Roszkiewicz, obecnie – dr hab. Kazimierz Jaśkiewicz). Klasyfikację histopatologiczną wszystkich skrawków, barwionych hematoksyliną-eozyną przeprowadzono zgodnie z klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia. Stopień zaawansowania nowotworu oceniano na podstawie skali pTNM według kryteriów UICC (87).

Grupę kontrolną stanowiło 277 osób. Kryterium doboru do tej grupy było wykluczenie jakiejkolwiek choroby nowotworowej w chwili przeprowadzenia badania, i w przeszłości.

Wszystkie osoby wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniu. Projekt uzyskał zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy AMG (nr NKEBN/854/2003).

Materiał do badań stanowiło DNA wyizolowane z leukocytów obwodowej krwi żyłnej. Próbkę krwi były pobierane od chorych przed zabiegiem operacyjnym, a od osób z grupy kontrolnej – podczas rutynowych badań stanu zdrowia. Krew pobierano każdorazowo do probówek próżniowych zawierających EDTA i przechowywano w temperaturze – 20 °C do czasu wykonania izolacji DNA.

Baza danych chorych na NDRP zawierała następujące informacje: wiek w chwili zabiegu operacyjnego, płeć, dane na temat palenia papierosów, datę zabiegu operacyjnego, stopień zaawansowania wg klasyfikacji pTNM, stopień zróżnicowania nowotworu, rozpoznanie histopatologiczne, datę ostatniej obserwacji lub datę zgonu, datę wznowy, lokalizację wznowy, wariant polimorficzny Ser326Cys genu *hOGG1*, wariant polimorficzny SNP309 genu

MDM2, obecność lub brak mutacji genu p53 oraz jej rodzaj. Baza osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną zawierała podstawowe informacje takie jak: wiek, płeć, informacje na temat palenia tytoniu, wariant polimorficzny Ser326Cys genu *hOGG1* oraz wariant polimorficzny SNP309 genu *MDM2*.

Dalsze informacje dotyczące przebiegu choroby gromadzono na podstawie danych z czterech źródeł: 1) dokumentacja medyczna Poradni Chirurgii Klatki Piersiowej przy Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej AMG, 2) dokumentacja medyczna Wojewódzkiej Przychodni Onkologicznej w Gdańsku (obecnie Wojewódzkie Centrum Onkologii), 3) informacje od lekarzy pierwszego kontaktu oraz 4) bezpośrednio od chorych i członków ich rodzin. Dane na temat daty zgonów otrzymywano od urzędów gminy lub urzędów stanu cywilnego.

4.2. Charakterystyka chorych na NDRP i osób z grupy kontrolnej

Grupę badaną stanowiło 142 chorych na NDRP. W grupie tej było 126 mężczyzn i 16 kobiet. Średni wiek chorych w momencie zabiegu wynosił 61 lat (zakres od 42 do 78).

W badanej grupie było 92 chorych, u których rozpoznano raka płaskonabłonkowego, 37 – gruczolakoraka, 7 – raka wielokomórkowego i 6 – raka o utkaniu mieszanym.

U 17 chorych stwierdzono raka dobrze zróżnicowanego (cecha G1), u 91 - raka średnio zróżnicowanego (cecha G2) i u 30 - raka nisko zróżnicowanego (cecha G3). U 4 chorych brak danych na temat stopnia zróżnicowania nowotworu.

W badanej grupie IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB i IV stopień zaawansowania według klasyfikacji pTNM stwierdzono odpowiednio u 7, 47, 1, 39, 34, 12 i 2 chorych. Na podstawie pooperacyjnego badania

histopatologicznego cechę T1 stwierdzono - u 9 chorych, cechę T2 - u 88 chorych, cechę T3 - u 33 chorych, a cechę T4 - u 12 chorych. U 75 chorych stwierdzono cechę N0, u 32 - cechę N1, a u 35 - cechę N2. Cecha M1 była obecna u 2 chorych, u pozostałych chorych stwierdzono cechę M0.

W odniesieniu do 134 chorych (94,4%) retrospektywnie uzyskano informacje na temat palenia papierosów. W grupie tej 89 osób paliło papierosy do czasu zabiegu operacyjnego lub rzuciło palenie w ciągu 6 miesięcy przed zabiegiem operacyjnym, 40 osób rzuciło palenie powyżej 6 miesięcy przed zabiegiem, a 5 nigdy nie było czynnymi palaczami papierosów. W grupie 99 chorych udało się ustalić dokładną liczbę paczkolet.

U 137 chorych (96,5%) udało się ustalić dane na temat przebiegu klinicznego choroby nowotworowej. Wśród chorych żyjących dwoje miało kliniczne cechy nawrotu. Wśród osób, które zmarły, u 70 wystąpił nawrót choroby, w tym u 23 stwierdzono wznowę miejscową, u 47 przerzuty odległe.

Grupę kontrolną stanowiło 277 osób bez choroby nowotworowej w chwili pobrania materiału na badanie i w przeszłości. W grupie tej było 249 mężczyzn i 28 kobiet. Średni wiek osób w grupie kontrolnej wynosił 58 (zakres 42 - 78 lat). 260 osób w tej grupie paliło papierosy, a 17 nigdy nie było czynnymi palaczami.

Tabela 2. Charakterystyka kliniczna chorych na NDRP (n = 142)

| Cecha kliniczna | | Liczba chorych (%) |
|--------------------------------------|---------------------|---------------------------|
| Wiek | Średnia | 61 |
| | Zakres | 42-78 |
| Płeć | Kobiety | 16 (11,3%) |
| | Mężczyźni | 126 (88,7%) |
| Typ histologiczny raka | Płaskonabłonkowy | 92 (64,8%) |
| | Gruzołowy | 37 (26,1%) |
| | Wielokomórkowy | 7 (4,9%) |
| | Mieszany | 6 (4,2%) |
| pT | T1 | 9 (6,3%) |
| | T2 | 88 (62,0%) |
| | T3 | 33 (23,2%) |
| | T4 | 12 (8,5%) |
| pN | N0 | 75 (52,8%) |
| | N1 | 32 (22,5%) |
| | N2 | 35 (24,7%) |
| pM | M0 | 140 (98,6%) |
| | M1 | 2 (1,4%) |
| Stopień zaawansowania patologicznego | IA | 7 (4,9%) |
| | IB | 47 (33,1%) |
| | IIA | 1 (0,7%) |
| | IIB | 39 (27,5%) |
| | IIIA | 34 (23,9%) |
| | IIIB | 12 (8,5%) |
| | IV | 2 (1,4%) |
| Stopień zróżnicowania raka | G1 | 17 (12,0%) |
| | G2 | 91 (64,1%) |
| | G3 | 30 (21,1%) |
| | brak danych | 4 (2,8%) |
| Palenie papierosów | Niepalący | 5 (3,5%) |
| | Obecni palacze | 89 (62,7%) |
| | Byli palacze | 40 (28,2%) |
| | Brak danych | 8 (5,6%) |
| Nawrót choroby | Bez nawrotu | 61 (43,0%) |
| | Miejscowy | 24 (16,9%) |
| | Odległy | 48 (33,8%) |
| | Miejscowy i odległy | 0 (0%) |
| | Zgon okołoperacyjny | 4 (2,8%) |
| | Brak danych | 5 (3,5%) |

5. METODY

5.1. Informacje ogólne

Analizę molekularną polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* oraz polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* autorka rozprawy wykonała w Zakładzie Biologii i Genetyki Akademii Medycznej w Gdańsku (Kierownik – prof. dr hab. Janusz Limon). Występowanie mutacji w genie *TP53* oceniono wcześniej w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej Uniwersytetu Gdańskiego (kierownik – prof. dr hab. Maciej Żylicz, wykonawca – dr Joanna Jakóbkiewicz-Banecka) oraz w Laboratorium Kliniki Onkologii Uniwersytetu w Lund (kierownik - dr Oke Borg, wykonawca – dr Amelia Szymanowska).

5.2. Izolacja DNA

DNA izolowano z leukocytów żyłnej krwi obwodowej, pobranej od chorych na NDRP i od osób z grupy kontrolnej do próbek próżniowych, zawierających kwas etylenodwuminoczteroowy (EDTA). Krew do chwili izolacji była przechowywana w temperaturze – 20 st C. Do izolacji genomowego DNA używano zestawu *Blood DNA Prep Plus (A&A Biotechnology*, nr katalogowy 022-250). Procedurę izolacji przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta.

5.3. Oznaczanie stężenia DNA

Stężenie wyizolowanego DNA mierzono za pomocą spektrofotometru Gene Quant II. Wynik odczytywano przy długości fali 260 nm.

5.4. Metody badania polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1*

5.4.1. ASA-PCR

Polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* badano przy użyciu metody ASA-PCR (*ang. allele specific amplification - polymerase chain reaction*). W celu określenia polimorfizmu przeprowadzono równocześnie dwie oddzielne reakcje, jedną dla allelu kodującego serynę, drugą dla allelu kodującego cysteinę ze względu na opisywany w bazie ENSEMBL (www.ensembl.org) polimorfizm występujący w pozycji 3 kodonu 326, który mógłby zafałszować wyniki, gdyby startery do ASA-PCR były zaprojektowane standardowo dla jednej reakcji. Startery zaprojektowano na podstawie sekwencji genu *hOGG1* dostępnej w bazie internetowej *National Center of Biotechnology Information (NCBI)* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Amplifikowaną sekwencję z uwzględnieniem miejsc komplementarnych do zastosowanych starterów przedstawiono na rycinie 8 (dla allelu kodującego serynę) i na rycinie 9 (dla allelu kodującego cysteinę). Zastosowane startery przedstawiono w tabeli 3.

Rycina 8. Sekwencja egzonu 7 genu *hOGG1* zawierająca kodon serynowy

ACTGTCACTAGTCTCACCAGCCCTGACCCCAGTGTACCCTC
 CTCCCCACACAGACTCCACCCTCCTACAGGTGCTGTTCA**AGT**
GCCGACCTGCGCCAATCCCGCCATGCTCAGGAGCCACCA
 GCAAAGCGCAGAAAGGGTTCCAAAGGGCCGGAAGGCTAG
 ATGGGGCACCCCTGGACAAAGAA**ATTCCCCAAGCACCTTCC**

Rycina 9. Sekwencja egzonu 7 genu *hOGG1* zawierająca kodon cysteinowy

ACTGTCACTAGTCTCACCAGCCCTGACCCCAGTGTACCCTC
 CTCCCCACACAGACTCCACCCTCCTACAGGTGCTGTTCA**AGT**
GCCGACCTGCGCCAATGCCGCCATGCTCAGGAGCCACCA
 GCAAAGCGCAGAAAGGGTTCCAAAGGGCCGGAAGGCTAG
 ATGGGGCACCCCTGGACAAAGAA**ATTCCCCAAGCACCTTCC**

Tabela 3. Startery do reakcji ASA-PCR

| Nazwa | Sekwencja |
|-------------------|--------------------------------|
| hOGG1_Forward | 5' – ACTGTCACTAGTCTCACCAG – 3' |
| hOGG1_Rewerse | 5' – GGAAGGTGCTTGGGGAAT – 3' |
| hOGG1_SER_Forward | 5' – AGTGCCGACCTGCGCCAATC – 3' |
| hOGG1_CYS_Forward | 5' – AGTGCCGACCTGCGCCAATG – 3' |

Tabela 4. Skład mieszaniny do reakcji ASA-PCR określającej obecność allelu kodującego syrenę

| Składnik mieszaniny | Stężenie | Objętość (μl) |
|---------------------|-----------|---------------|
| Bufor | 10x | 2,5 |
| MgCl ₂ | 25mM | 2,5 |
| dNTPs | 10mM | 1,0 |
| hOGG1_Forward | 10pmol/μl | 0,5 |
| hOGG1_Rewerse | 10pmol/μl | 0,5 |
| hOGG1_SER_Forward | 10pmol/μl | 1,0 |
| Polimeraza Taq Gold | 5U/μl | 0,1 |
| ddH ₂ O | - | 15,9 |
| DNA | 60ng/μl | 1,0 |
| Razem | - | 25 |

Tabela 5. Skład mieszaniny do reakcji ASA-PCR określającej obecność allelu kodującego cysteinę

| Składnik mieszaniny | Stężenie | Objętość (μl) |
|---------------------|-----------|---------------|
| Bufor | 10x | 2,5 |
| MgCl ₂ | 25mM | 2,5 |
| dNTPs | 10mM | 1,0 |
| hOGG1_Forward | 10pmol/μl | 0,5 |
| hOGG1_Rewerse | 10pmol/μl | 0,5 |
| hOGG1_CYS_Forward | 10pmol/μl | 1,0 |
| Polimeraza Taq Gold | 5U/μl | 0,1 |
| ddH ₂ O | - | 15,9 |
| DNA | 60ng/μl | 1,0 |
| Razem | - | 25 |

Mieszanki o składzie przedstawionym w tabelach 4 i 5, z wyjątkiem DNA, rozdzielano do probówek PCR o objętości 200 μ l. Następnie dodawano matrycowe DNA. Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 25 μ l. Przed kolejnym etapem krótko wortexowano i odwirowywano próbki. Reakcję PCR przeprowadzano wykorzystując termocykler GeneAmp PCR System 2700.

Reakcja amplifikacji przebiegała w doświadczalnie ustalonych warunkach, przedstawionych w tabeli 6. W celu kontroli prawidłowego przeprowadzenia reakcji PCR do każdej reakcji dołączano kontrolę negatywną, w której DNA zastępowano taką samą objętością podwójnie destylowanej wody.

Tabela 6. Warunki reakcji ASA-PCR

| Etap | Temperatura (°C) | Czas (min.) | Liczba cykli |
|------------------------|------------------|-------------|--------------|
| Wstępna denaturacja | 95 | 5:00 | - |
| Denaturacja | 95 | 0:30 | 35 |
| Przyłączanie starterów | 56 | 0:45 | |
| Wydłużanie | 72 | 1:30 | |
| Końcowe wydłużanie | 72 | 7:00 | - |

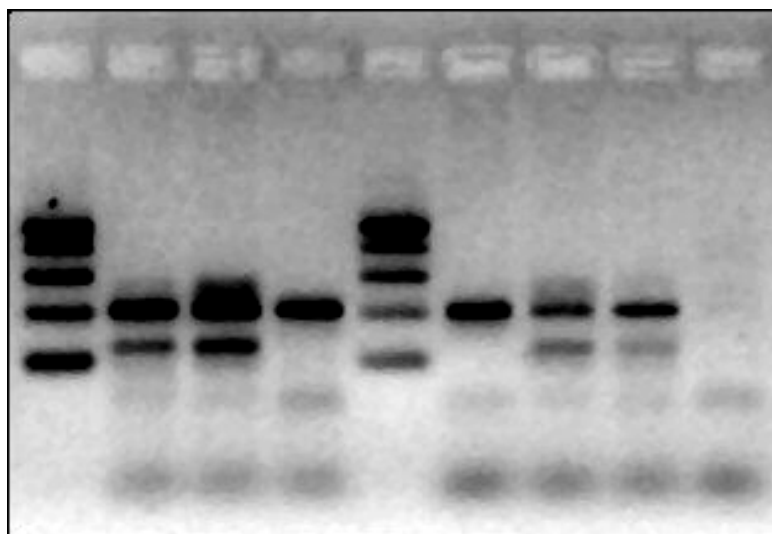
Po zakończeniu reakcji PCR próbki wirowano, a następnie pobierano z każdej 10 μ l produktu PCR, które dodawano do 3 μ l buforu obciążającego. Tak przygotowaną mieszaninę наносono, na wcześniej przygotowany 2% żel agarozowy wybarwiony bromkiem etydyny. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano w buforze TBE, przy napięciu 200V przez 30 minut. Rozdziały elektroforetyczne poddawano wizualizacji w świetle UV na transluminatorze. Długość produktów oceniano względem wzorca masowego DNA. Fotografie i archiwizację uzyskanych wyników wykonywano przy pomocy aparatury Gel Doc 2000 firmy Bio Rad i programu Quantity One.

Rozdział elektroforetyczny dla poszczególnych wariantów polimorficznych przedstawiono na rycinie 10. Ścieżki 2,3,4 przedstawiają produkty amplifikacji ze starterem specyficznym dla allelu kodującego serynę, a ścieżki 6,7,8 przedstawiają produkty amplifikacji ze starterem specyficznym dla allelu kodującego cysteinę. Analizując wyniki obu reakcji można różnicować wariant homozygotyczny kodujący tylko serynę (ścieżki 1 i 4), wariant heterozygotyczny (ścieżki 2 i 5) i wariant homozygotyczny kodujący tylko cysteinę (ścieżki 3 i 6).

Rycina 10. Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA otrzymanych w wyniku reakcji ASA-PCR

- MW Marker wielkości 100-500 pz
- 1 i 4 Produkty amplifikacji dla homozygoty Ser/Ser
- 2 i 5 Produkty amplifikacji dla heterozygoty Ser/Cys
- 3 i 6 Produkty amplifikacji dla homozygoty Cys/Cys
- KN Kontrola negatywna

MW 1 2 3 MW 4 5 6 KN



5.4.2. *Nested PCR*

W wybranych próbkach, ze względu na niską wydajność PCR, przeprowadzano *nested PCR*. W reakcji *nested PCR* używa się dwóch par starterów, z których wewnętrzna para przyłącza się do sekwencji przyśrodkowo do pierwszej pary. Otrzymany produkt amplifikacji z pierwszą parą staje się więc matrycą dla drugiej pary starterów, co znacznie zwiększa specyficzność reakcji PCR.

Metodą *nested PCR* oznaczono 81 próbek. Pierwszą reakcję PCR przeprowadzano ze starterami zewnętrznymi, a drugą ze starterami wewnętrznymi oraz starterem specyficznym dla allelu kodującego serynę lub starterem specyficznym dla allelu kodującego cysteinę (tabela 7). Startery zewnętrzne i specyficzne były identyczne jak stosowane w opisanej poprzednio metodzie ASA-PCR. Startery wewnętrzne również zaprojektowano na podstawie sekwencji genu *hOGG1* dostępnej w bazie internetowej *National Center of Biotechnology Information (NCBI)* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabela 7. Startery do reakcji *nested PCR*

| Nazwa | Rodzaj | Sekwencja |
|-------------------|-------------|--------------------------------|
| hOGG1_Forward | zewnętrzny | 5' – ACTGTCACTAGTCTCACCAG – 3' |
| hOGG1_Rewerse | zewnętrzny | 5' – GGAAGGTGCTTGGGGAAT – 3' |
| hOGG1_N_Forward | wewnętrzny | 5' – TCACCAGCCCTGACCCCAGT – 3' |
| hOGG1_N_Rewerse | wewnętrzny | 5, - GTCCAGGGTGCCCCATCTAG – 3' |
| hOGG1_SER_Forward | specyficzny | 5' – AGTGCCGACCTGCGCCAATC – 3' |
| hOGG1_CYS_Forward | specyficzny | 5' – AGTGCCGACCTGCGCCAATG – 3' |

Amplifikowaną sekwencję z uwzględnieniem miejsc komplementarnych do zastosowanych starterów przedstawiono na rycinie 11 (dla allelu kodującego serynę) i na rycinie 12 (dla allelu kodującego cysteinę).

Rycina 11. Sekwencja egzonu 7 genu *hOGG1* zawierająca kodon serynowy

ACTGTCACTAGTCTCACCAGCCCTGACCCCAGTGTACCCTC
 CTCCCCACACAGACTCCACCCTCCTACAGGTGCTGTTCAGT
 GCCGACCTGCGCCAATCCCGCCATGCTCAGGAGCCACCA
 GCAAAGCGCAGAAAGGGTTCCAAAGGGCCGGAAGGCTAG
 ATGGGGCACCCCTGGACAAAGAAATTCCCCAAGCACCTTCC

Rycina 12. Sekwencja egzonu 7 genu *hOGG1* zawierająca kodon cysteinowy

ACTGTCACTAGTCTCACCAGCCCTGACCCCAGTGTACCCTC
 CTCCCCACACAGACTCCACCCTCCTACAGGTGCTGTTCAGT
 GCCGACCTGCGCCAATCCCGCCATGCTCAGGAGCCACCA
 GCAAAGCGCAGAAAGGGTTCCAAAGGGCCGGAAGGCTAG
 ATGGGGCACCCCTGGACAAAGAAATTCCCCAAGCACCTTCC

Tabela 8. Skład mieszaniny do reakcji ze starterami zewnętrznymi

| Składnik mieszaniny | Stężenie | Objętość (μl) |
|---------------------|-----------|---------------|
| Bufor | 10x | 3,5 |
| MgCl ₂ | 25mM | 2,0 |
| dNTPs | 10mM | 1,0 |
| hOGG1_Forward | 10pmol/μl | 1,0 |
| hOGG1_Rewerse | 10pmol/μl | 1,0 |
| Polimeraza Taq Gold | 5U/μl | 0,1 |
| ddH ₂ O | - | 25,5 |
| DNA | 60ng/μl | 1,0 |
| Razem | - | 35 |

Mieszaninę o składzie przedstawionym w tabeli 8, z wyjątkiem DNA, rozdzielano do probówek PCR o objętości 200 μ l. Następnie dodawano matrycowe DNA. Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 35 μ l. Przed kolejnym etapem krótko wortexowano i odwirowywano próbki. Reakcję PCR przeprowadzano wykorzystując termocykler GeneAmp PCR System 2700.

Reakcja amplifikacji przebiegała w doświadczalnie ustalonych warunkach, przedstawionych w tabeli 9. Do każdej amplifikacji dołączano kontrolę negatywną, w której DNA zastępowano taką samą objętością podwójnie destylowanej wody.

Tabela 9. Warunki reakcji ze starterami zewnętrznymi

| Etap | Temperatura ($^{\circ}$ C) | Czas (min.) | Liczba cykli |
|------------------------|-----------------------------|-------------|--------------|
| Wstępna denaturacja | 95 | 5:00 | - |
| Denaturacja | 95 | 0:30 | 20 |
| Przyłączanie starterów | 56 | 0:30 | |
| Wydłużanie | 72 | 0:30 | |
| Końcowe wydłużanie | 72 | 7:00 | - |

Po zakończeniu reakcji PCR próbki wirowano, a następnie pobierano z każdej 10 μ l produktu PCR, które dodawano do 3 μ l buforu obciążającego. Tak przygotowaną mieszaninę наносono, na wcześniej przygotowany 2% żel agarozowy wybarwiony bromkiem etydyny. Elektroforezę przeprowadzano w buforze TBE, przy napięciu 200V przez 20 minut. Następnie w świetle UV na transluminatorze sprawdzano obecność produktu reakcji ze starterami zewnętrznymi. Długość produktu oceniano względem wzorca masowego DNA. Fotografie i archiwizację uzyskanych wyników wykonywano przy pomocy aparatury Gel Doc 2000 firmy Bio Rad i programu Quantity One.

W następnym etapie przeprowadzano drugą reakcję PCR, ze starterami wewnętrznymi oraz starterem specyficznym dla allelu kodującego serynę lub starterem specyficznym dla allelu kodującego cysteinę.

Tabela 10. Skład mieszaniny do reakcji ze starterami wewnętrznymi oraz starterem specyficznym dla allelu kodującego serynę

| Składnik mieszaniny | Stężenie | Objętość (μl) |
|---------------------|-----------|---------------|
| Bufor | 10x | 3,5 |
| MgCl ₂ | 25mM | 1,0 |
| dNTPs | 10mM | 1,0 |
| hOGG1_N_Forward | 10pmol/μl | 1,0 |
| hOGG1_N_Rewerse | 10pmol/μl | 1,0 |
| hOGG1_SER_Forward | 10pmol/μl | 2,0 |
| Polimeraza Taq Gold | 5U/μl | 0,1 |
| ddH ₂ O | - | 23,5 |
| Produkt PCR | - | 2,0 |
| Razem | - | 35 |

Tabela 11. Skład mieszaniny do reakcji ze starterami wewnętrznymi oraz starterem specyficznym dla allelu kodującego cysteinę

| Składnik mieszaniny | Stężenie | Objętość (μl) |
|---------------------|-----------|---------------|
| Bufor | 10x | 3,5 |
| MgCl ₂ | 25mM | 1,0 |
| dNTPs | 10mM | 1,0 |
| hOGG1_N_Forward | 10pmol/μl | 1,0 |
| hOGG1_N_Rewerse | 10pmol/μl | 1,0 |
| hOGG1_CYS_Forward | 10pmol/μl | 2,0 |
| Polimeraza Taq Gold | 5U/μl | 0,1 |
| ddH ₂ O | - | 23,5 |
| Produkt PCR | - | 2,0 |
| Razem | - | 35 |

Mieszanki o składzie przedstawionym w tabelach 10 i 11, z wyjątkiem produktu otrzymanego w wyniku amplifikacji ze starterami zewnętrznymi, rozdzielano do probówek PCR o objętości 200 μ l. Następnie dodawano produkt PCR. Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 35 μ l. Przed kolejnym etapem krótko wortexowano i odwirowywano próbki. Reakcję PCR przeprowadzano wykorzystując Termocykler GeneAmp PCR System 2720.

Reakcja amplifikacji przebiegała w doświadczalnie ustalonych warunkach, przedstawionych w tabeli 12. Do każdej amplifikacji dołączano kontrolę negatywną, w której produkt PCR zastępowano taką samą objętością podwójnie destylowanej wody.

Tabela 12. Warunki reakcji ze starterami wewnętrznymi i specyficznymi

| Etap | Temperatura ($^{\circ}$ C) | Czas (min.) | Liczba cykli |
|------------------------|-----------------------------|-------------|--------------|
| Wstępna denaturacja | 95 | 5:00 | - |
| Denaturacja | 95 | 0:30 | 35 |
| Przyłączanie starterów | 66 | 0:30 | |
| Wydłużanie | 72 | 0:30 | |
| Końcowe wydłużanie | 72 | 7:00 | - |

Po zakończeniu reakcji PCR próbki wirowano, a następnie pobierano z każdej 10 μ l produktu PCR, które dodawano do 3 μ l buforu obciążającego. Tak przygotowaną mieszaninę наносono, na wcześniej przygotowany 2% żel agarozowy wybarwiony bromkiem etydyny. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano w buforze TBE, przy napięciu 200V przez 30 minut. Rozdziały elektroforetyczne poddawano wizualizacji w świetle UV na transluminatorze. Długość produktów oceniano względem wzorca masowego DNA. Fotografie i archiwizację uzyskanych wyników wykonywano przy pomocy aparatury Gel Doc 2000 firmy Bio Rad i programu Quantity One. Identyfikację wariantów polimorficznych przeprowadzano w ten sam sposób jak opisano w rozdziale 4.4.1. ASA-PCR.

5.4.3. Sekwencjonowanie produktów PCR

W celu weryfikacji otrzymanych wyników zsekwencjonowano 65 losowo wybranych próbek (15%). Wybrane do sekwencjonowania próbki powtórnie amplifikowano za pomocą reakcji *nested* PCR. Obecność uzyskanych produktów sprawdzano za pomocą elektroforezy agarozowej, jak opisano powyżej w rozdziale 4.4.2. *Nested* PCR. Następnie amplifikowane fragmenty DNA oczyszczano z genomowego DNA i starterów przy użyciu zestawu *Clean-up* (A&A Biotechnology, Polska).

Oczyszczone produkty PCR były bezpośrednio sekwencjonowane. Do reakcji stosowano starter antysensowy. Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania przedstawiono w tabeli 13. Warunki oraz profil temperaturowy reakcji były zgodne z zaleceniami firmy Applied Biosystems (tabela 14).

Tabela 13. Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania

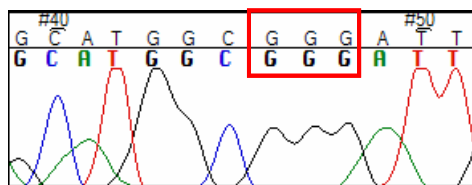
| Składnik mieszaniny | Objętość (μl) |
|--|---------------|
| BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v 3.1 | 2 |
| 5xbufor do sekwencjonowania | 4 |
| Starter (1μM) | 2 |
| Matrycowe DNA (produkt PCR) | 12 |
| Razem | 20 |

Tabela 14. Warunki reakcji sekwencjonowania

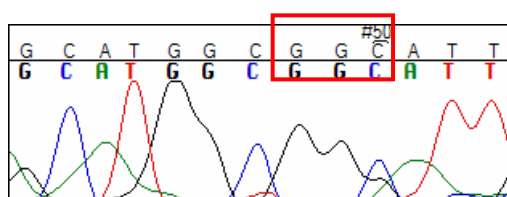
| Temperatura (°C) | Czas (min.) | Liczba cykli |
|------------------|-------------|--------------|
| 96°C | 1:00 | - |
| 96°C | 0:10 | 25 |
| 50°C | 0:05 | |
| 60°C | 4:00 | |

W celu usunięcia nadmiaru znakowanych dwudeoksynukleotydów (ddNTPS) produkt reakcji oczyszczano przy użyciu zestawu *ExTerminator* (A&A Biotechnology, Polska). Tak przygotowane próbki denaturowano przy użyciu termocyklera w temperaturze 95°C, przez 5 minut, następnie chłodzono do temperatury 4°C. Próbki analizowano przy użyciu automatycznego sekwenatora *ABI PRISM 310* oraz programów *ABI PRISM 310 Data Collection Software v 2.0* i *ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software v 3.7*. Otrzymane sekwencje porównywano z sekwencją prawidłową przy użyciu programu *Sequencher v 4.7 demo* (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA).

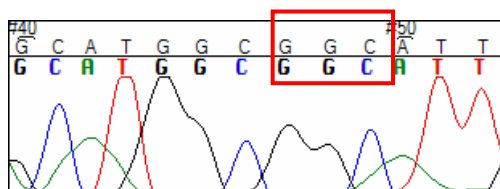
Rycina 13. Sekwencjonowanie fragmentu egzonu 7 genu *hOGG1* zawierającego kodon 326 – wariant polimorficzny Ser/Ser



Rycina 14. Sekwencjonowanie fragmentu egzonu 7 genu *hOGG1* zawierającego kodon 326 – wariant polimorficzny Ser/Cys



Rycina 15. Sekwencjonowanie fragmentu egzonu 7 genu *hOGG1* zawierającego kodon 326 – wariant polimorficzny Cys/Cys



5.5. Metody badania polimorfizmu SNP309 genu *MDM2*

5.5.1. RFLP-PCR

Polimorfizm SNP309 genu *MDM2* badano przy użyciu metody RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism* – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych). Tą metodą wykrywa się różnice pomiędzy rozmiarami fragmentów DNA pociętych enzymami restrykcyjnymi. Różnice długości fragmentów DNA powstają w wyniku polimorfizmu/mutacji, w wyniku których są tworzone lub eliminowane miejsca rozpoznawane przez te

enzymy. Badanie polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* wykonano przy użyciu metody opisanej wcześniej przez Sotamaa K (112). Amplifikowaną sekwencję z uwzględnieniem miejsc komplementarnych do zastosowanych starterów przedstawiono na rycinie 16. Zastosowane startery przedstawiono w tabeli 15.

Rycina 16. Fragment sekwencji promotorowej genu *MDM2*

```

CGCGGGAGTTCAGGGTAAAGGTCACGGGGGCCGGGGGCT
GCGGGGCCGCTT/GCGGCGCGGGAGGTCCGGATGATCGCA
GGTGCCTGTCGGGTCACTAGTGTGAACGCTGCGCGTAGTC
TGGGCGGGATTGGGCCGGTT CAGTGGGCAGGTTGACTCAG
    
```

Tabela 15. Startery do reakcji PCR

| Nazwa | Sekwencja |
|--------------|--------------------------------|
| MDM2_Forward | 5' – CGCGGGAGTTCAGGGTAAAG – 3' |
| MDM2_Rewerse | 5' – CTGAGTCAACCTGCCCACTG – 3' |

Tabela 16. Skład mieszaniny do reakcji PCR

| Składnik mieszaniny | Stężenie | Objętość/próbkę (μl) |
|---------------------|-----------|----------------------|
| Bufor | 10x | 2,5 |
| MgCl ₂ | 25mM | 1,5 |
| dNTPs | 10mM | 0,5 |
| MDM2_Forward | 10pmol/μl | 0,3 |
| MDM2_Rewerse | 10pmol/μl | 0,3 |
| Polimeraza Taq | 5U/μl | 0,1 |
| ddH ₂ O | - | 18,9 |
| DNA | 60ng/μl | 1,0 |
| Razem | - | 25 |

Mieszaninę o składzie przedstawionym w tabeli 16, z wyjątkiem DNA, rozdzielano do próbek PCR o objętości 200 μ l. Następnie dodawano matrycowe DNA. Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 25 μ l. Przed kolejnym etapem krótko wortexowano i odwirowywano próbki. Reakcję PCR przeprowadzano wykorzystując Termocykler GeneAmp PCR System 2700.

Reakcja amplifikacji przebiegała warunkach, przedstawionych w tabeli 17. W celu kontroli prawidłowego przeprowadzenia reakcji PCR do każdej reakcji dołączano kontrolę negatywną, w której DNA zastępowano taką samą objętością podwójnie destylowanej wody.

Tabela 17. Warunki reakcji PCR

| Etap | Temperatura ($^{\circ}$ C) | Czas (min.) | Liczba cykli |
|------------------------|-----------------------------|-------------|--------------|
| Wstępna denaturacja | 94 | 5:00 | - |
| Denaturacja | 94 | 0:30 | 35 |
| Przyłączanie starterów | 60 | 0:30 | |
| Wydłużanie | 72 | 1:00 | |
| Końcowe wydłużanie | 72 | 7:00 | - |

Skuteczność reakcji PCR kontrolowano przy użyciu elektroforezy w 2% żelu agarozowym, a następnie produkt amplifikacji o długości 158 par zasad trawiono enzymem restrykcyjnym MspAII (New England BioLabs).

Tabela 18. Skład mieszaniny przygotowanej do reakcji trawienia

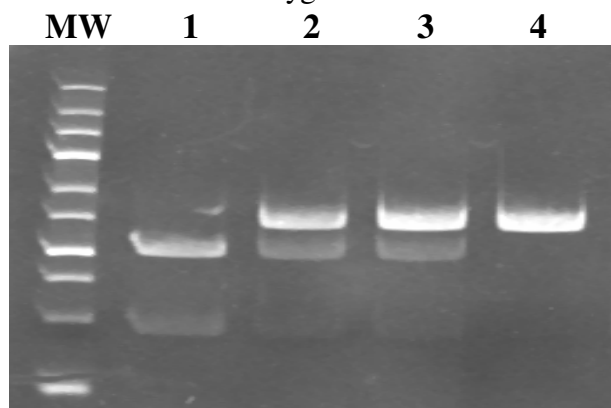
| Składnik mieszaniny | Objętość/próbkę (μ l) |
|---------------------|----------------------------|
| Bufor NE | 2,5 |
| BSA | 0,5 |
| Enzym MspAII | 0,6 |
| Razem | 3,6 |

Mieszaninę o składzie przedstawionym w tabeli 18 dodawano do 15 μ l produktu PCR, następnie wortexowano i krótko odwirowywano. Reakcja trawienia zachodziła podczas 16 godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji próbki wirowano, a następnie pobierano z każdej 5 μ l produktu, które dodawano do 2 μ l buforu obciążającego. Tak przygotowaną mieszaninę nanoszono, na wcześniej przygotowany 10% żel poliakrylamidowy. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR po trawieniu przeprowadzano w buforze TAE, przy napięciu 200V przez 30 minut. Następnie przez około 3 minuty wybarwiano żel w buforze zawierającym bromek etydyny (200ml TAE i 20 μ l bromku etydyny). Rozdziały elektroforetyczne poddawano wizualizacji w świetle UV na transluminatorze. Długość produktów oceniano względem wzorca masowego DNA. Fotografie i archiwizację uzyskanych wyników wykonywano przy pomocy aparatury Gel Doc 2000 firmy Bio Rad i programu Quantity One.

Enzym restrykcyjny MspA1I rozpoznaje sekwencję 5' – CTGCGG – 3', która występuje, jeśli w *locus* 309 znajduje się guanina i przecina wówczas amplifikowany fragment o długości 158 par zasad na dwa fragmenty o długości 107 i 51 par zasad. Przykładowy żel poliakrylamidowy z rozdziałem elektroforetycznym przedstawiono na rycinie 17.

Rycina 17. Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA otrzymanych w wyniku reakcji RFLP-PCR

| | |
|-------|----------------------------|
| MW | Marker wielkości 25-700 pz |
| 1 | Homozygota SNP309 G/G |
| 2 i 3 | Heterozygoty SNP309 G/T |
| 4 | Homozygota SNP309 T/T |



5.6. Metody badania mutacji genu *TP53*

Analizę występowania mutacji w genie *TP53* przeprowadzono wcześniej. U 75 chorych występowanie mutacji w genie *TP53* oceniono przy użyciu metody SSCP w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej Uniwersytetu Gdańskiego (kierownik – prof. dr hab. Maciej Żylicz, wykonawca – dr Joanna Jakóbkiewicz-Banecka). Obecność wszystkich mutacji wykrytych metodą SSCP potwierdzono sekwencjonowaniem. U 67 chorych występowanie mutacji w genie *TP53* oceniono metodą bezpośredniego sekwencjonowania w Laboratorium Kliniki Onkologii Uniwersytetu w Lund (kierownik - dr Oke Borg, wykonawca – dr Amelia Szymanowska). Badania przeprowadzono zgodnie z opisem w publikacjach (65, 116).

Aparaturę, odczynniki i roztwory stosowane w analizie molekularnej przedstawiono w załączniku 1.

5.7. Metody analizy statystycznej

Analizę opisową przeprowadzono przedstawiając proporcje odsetkowe dla zmiennych kategoryzowanych oraz medianę i zakres dla zmiennych ciągłych. Test równowagi Hardy’ego-Weinberga sprawdzono za pomocą modyfikacji testu dokładnego Fishera (48). Zmienne kategoryzowane porównano za pomocą testu chi-kwadrat lub testu dokładnego Fishera w zależności od liczebności oczekiwanych. Zmienne ciągłe porównano nieparametrycznym testem Kruskala-Wallisa. Analizę ryzyka zachorowania na NDRP w zależności od badanych polimorfizmów przeprowadzono według trzech modeli genetycznych (139), podając współczynniki ryzyka (ang. *Odds ratio*) i 95% zakresy ufności na podstawie analizy regresji logistycznej jednoczynnikowej i wieloczynnikowej, po skorygowaniu o podstawowe dane demograficzne (wiek, płeć, historia palenia tytoniu).

W analizie przeżycia zastosowano metodę Kaplana-Meiera. Krzywe przeżycia porównano testem log-rank. Przeprowadzono jedno- i wieloczynnikową analizę według modelu proporcjonalnego ryzyka Cox'a według trzech wcześniej opisanych modeli genetycznych. Nieskorygowane i skorygowane współczynniki ryzyka zgonu (ang. *hazard ratio*) podano wraz z odpowiadającym im 95% zakresem ufności.

W analizie ryzyka zachorowania na NDRP w zależności od obu polimorfizmów wykorzystano wskaźnik ryzyka (ang. *risk score*). Wskaźnik ryzyka został zbudowany na podstawie analizy jednoczynnikowej polimorfizmów z uwzględnieniem następujących czynników ryzyka:

hOGG1 Ser/Cys – 1 punkt

hOGG1 Cys/Cys – 2 punkty

MDM2 G/G – 1 punkt

Inne warianty polimorficzne – 0 punktów

Dla oceny łącznej wartości predykcyjnej analizy genotypów dla ryzyka zachorowania na raka płuca zastosowano model wieloczynnikowej regresji logistycznej, skorygowany o analizowane cechy demograficzne (wiek, płeć, historia palenia tytoniu). Do analizy włączono model addytywny polimorfizmu genu *hOGG1* i model recesywny polimorfizmu genu *MDM2* (na podstawie analizy jednoczynnikowej).

We wnioskowaniu zastosowano poziom istotności statystycznej $\alpha=0,05$. Nie stosowano poprawek dla wielokrotności testowania. Wszystkie przeprowadzone testy statystyczne były obustronne. Do analizy wykorzystano programy statystyczne SPSS 14,0 oraz Statsdirect 2,0.

6. WYNIKI

6.1. Polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1*

6.1.1. Częstość występowania wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* u chorych na NDRP i w grupie kontrolnej

Częstość występowania wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* określono u 142 chorych na NDRP i u 277 osób z grupy kontrolnej obejmującej osoby zdrowe. Stwierdzono istotne różnice w rozkładzie genotypów i alleli pomiędzy badanymi grupami ($p < 0,001$). Wariant polimorficzny Ser/Ser stwierdzono u 57,7% chorych na NDRP i u 78,7% osób z grupy kontrolnej. Heterozygoty stanowiły 34,5% chorych i 18,8% osób z grupy kontrolnej, a homozygoty Cys/Cys - 7,7% chorych i 2,5% osób zdrowych. Częstość występowania allelu Cys wynosiła 25,0% w grupie chorych i 11,9% w grupie kontrolnej ($p < 0,001$). W tabeli 19 przedstawiono rozkład poszczególnych wariantów polimorficznych oraz alleli u chorych na NDRP i w grupie kontrolnej.

Tabela 19. Rozkład wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* w grupie chorych na NDRP i w grupie kontrolnej

| Ser326Cys | Chorzy | Grupa kontrolna | p |
|---------------------|------------|-----------------|------------------|
| Ser/Ser (%) | 82 (57,7%) | 218 (78,7%) | <0,001 |
| Ser/Cys (%) | 49 (34,5%) | 52 (18,8%) | |
| Cys/Cys (%) | 11 (7,7%) | 7 (2,5%) | |
| Częstość allelu Cys | 25,0 % | 11,9 % | <0,001 |

Nie stwierdzono istotnych odchyień rozkładu genotypów od rozkładu określonego przez test równowagi Hardy'ego-Weinberga w grupie kontrolnej ($p = 0,084$).

6.1.2. Polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP

Ryzyko zachorowania na NDRP w odniesieniu do wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* rozpatrywano wykorzystując trzy modele porównawcze: recesywny, dominujący i addytywny. We wszystkich modelach stwierdzono istotnie zwiększone ryzyko zachorowania na NDRP u nosicieli allelu Cys, zarówno przed, jak i po skorygowaniu względem płci, wieku i historii palenia tytoniu (tabela 20 i tabela 21). Największe ryzyko zachorowania na NDRP stwierdzono w modelu addytywnym dla homozygot cysteinowych (OR=3,78; 95% CI=1,39-10,28).

Tabela 20. Analiza współczynników ryzyka (OR) i 95% zakresów ufności (95% CI) dla polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1*. Model surowy (nieskorygowany)

| | OR (95% CI) | P |
|--|----------------------|-------------------|
| Model recesywny Cys/Cys vs Cys/Ser + Ser/Ser | 3,24 (1,23-8,55) | 0,0176 |
| Model dominujący Cys/Cys + Cys/Ser vs Ser/Ser | 2,70 (1,74-4,20) | <0,0001 |
| Model addytywny Cys/Ser vs Ser/Ser | 2,51 (1,57-3,99) | 0,0001 |
| Cys/Cys vs Ser/Ser | 4,18 (1,57-11,14) | 0,0043 |

Tabela 21. Analiza współczynników ryzyka (OR) i 95% zakresów ufności (95% CI) dla polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1*. Model skorygowany względem płci, wieku i historii palenia tytoniu

| | OR (95% CI) | P |
|--|----------------------|-------------------|
| Model recesywny Cys/Cys vs Cys/Ser + Ser/Ser | 2,81 (1,04-7,56) | 0,041 |
| Model dominujący Cys/Cys + Cys/Ser vs Ser/Ser | 2,84 (1,80-4,48) | <0,0001 |
| Model addytywny Cys/Ser vs Ser/Ser | 2,70 (1,67-4,37) | <0,0001 |
| Cys/Cys vs Ser/Ser | 3,78 (1,39-10,28) | 0,009 |

6.1.3. Kliniczna wartość polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* u chorych na NDRP

W analizie zależności pomiędzy wariantami polimorficznymi Ser326Cys genu *hOGG1* a cechami klinicznymi uwzględniono płeć i wiek chorych, palenie tytoniu, postać histologiczną raka, cechę T i cechę N w skali pTNM oraz stopień zróżnicowania guza. Wykazano znamienne różnice w rozkładzie wariantów polimorficznych w zależności od cechy pN. Nie wykazano zależności pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych a płcią, wiekiem, historią palenia tytoniu, postacią histologiczną raka, cechą pT oraz stopniem zróżnicowania guza (tabela 22).

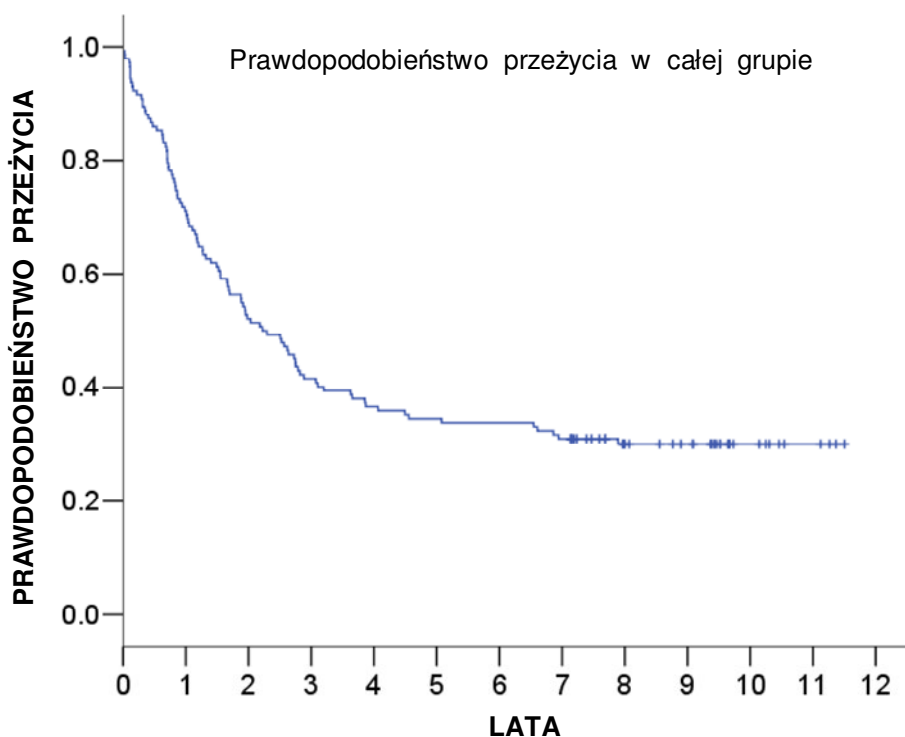
Tabela 22. Analiza związku pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* a wybranymi cechami klinicznymi chorych na NDRP

| Cecha | Wariant Ser/Ser n (%) | Wariant Ser/Cys n (%) | Wariant Cys/Cys n (%) | p |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|
| Płeć | | | | |
| Mężczyźni | 72 (88%) | 44 (90%) | 10 (91%) | 0,915 |
| Kobiety | 10 (12%) | 5 (10%) | 1 (9%) | |
| Wiek | | | | |
| Mediana | 62 | 60 | 64 | 0,617 |
| Zakres | 43-75 | 42-78 | 43-73 | |
| Palenie tytoniu | | | | |
| Nie | 4 (5%) | 1 (2%) | 0 (0%) | 0,498 |
| Tak | 70 (95%) | 48 (98%) | 11 (100%) | |
| Postać histologiczna raka | | | | |
| SCC | 54 (66%) | 32 (65%) | 6 (55%) | 0,852 |
| AC | 22 (26%) | 11 (23%) | 4 (36%) | |
| LCC | 3 (4%) | 3 (6%) | 1 (9%) | |
| mieszany | 3 (4%) | 3 (6%) | 0 (0%) | |
| pT | | | | |
| T1 | 5 (6%) | 1 (2%) | 3 (27%) | 0,082 |
| T2 | 53 (65%) | 29 (59%) | 6 (55%) | |
| T3 | 18 (22%) | 14 (29%) | 1 (9%) | |
| T4 | 6 (7%) | 5 (10%) | 1 (9%) | |
| pN | | | | |
| N0 | 52 (63%) | 17 (34%) | 6 (55%) | 0,030 |
| N1 | 13 (16%) | 16 (33%) | 3 (27%) | |
| N2 | 17 (21%) | 16 (33%) | 2 (18%) | |
| Stopień zróżnicowania | | | | |
| G1 | 7 (9%) | 8 (17%) | 2 (18%) | 0,488 |
| G2 | 53 (66%) | 30 (64%) | 8 (73%) | |
| G3 | 20 (25%) | 9 (19%) | 1 (9%) | |

6.1.4. Rokownicza wartość polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* u chorych na NDRP

Do chwili zamknięcia bazy danych (grudzień 2007) żyło 43 chorych (30,3%), a zmarło 99 (69,7%). Cztery osoby zmarły w okresie pooperacyjnym, czyli w ciągu pierwszego miesiąca po zabiegu. Mediana czasu obserwacji dla całej grupy chorych wynosiła 9,4 lat, a zakres od 7,1 do 11,5 lat. Mediana czasu przeżycia chorych wynosiła 2,2 lata (95% CI: 1,6 – 2,9 lat) (rycina 18). Prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia wynosiło 35% (95% CI: 27 - 42%).

Rycina 18. Prawdopodobieństwo przeżycia w badanej grupie chorych na NDRP (n=142)

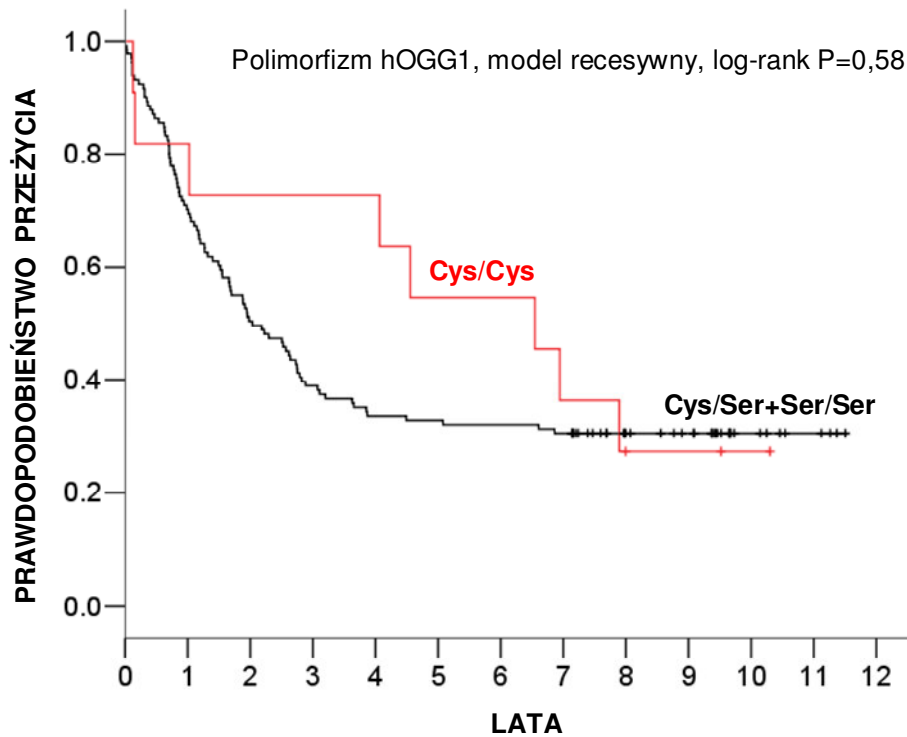


Związek pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* a czasem całkowitego przeżycia rozpatrywano wykorzystując trzy modele porównawcze: recesywny, dominujący i addytywny. Nie stwierdzono związku pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych a czasem całkowitego przeżycia w żadnym z wymienionych wyżej modeli (tabela 23) (ryciny 19-21). Nie stwierdzono także związku pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych a medianą czasu przeżycia chorych. (tabela 24).

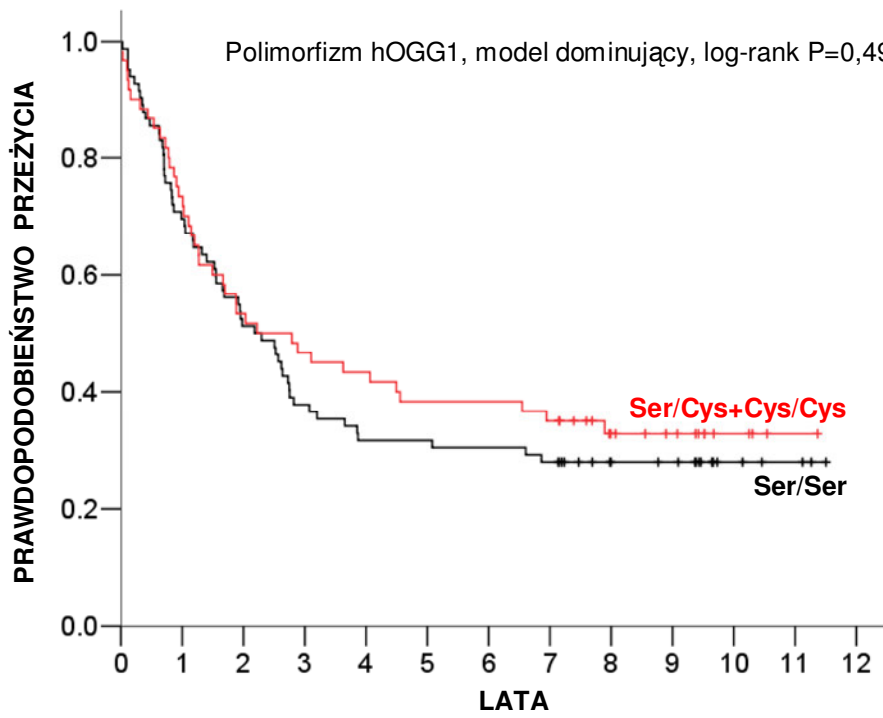
Tabela 23. Polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* - analiza czasu przeżycia (model nieskorygowany i skorygowany o płeć, wiek i stopień zaawansowania)

| | HR_{sur} (95% CI) | P | HR_{koryg} (95% CI) | P |
|--|--|----------|--|----------|
| Model recesywny Cys/Cys vs Cys/Ser + Ser/Ser | 0,82 0,40-1,69 | 0,583 | 0,84 0,41-1,75 | 0,643 |
| Model dominujący Cys/Cys + Cys/Ser vs Ser/Ser | 0,87 0,58-1,30 | 0,494 | 0,71 0,47-1,08 | 0,113 |
| Model addytywny Cys/Ser vs Ser/Ser | 0,89 0,58-1,37 | 0,609 | 0,71 0,45-1,11 | 0,130 |
| Cys/Cys vs Ser/Ser | 0,78 0,37-1,64 | 0,518 | 0,74 0,35-1,56 | 0,430 |

Rycina 19. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na NDRP w zależności od wariantu polimorficznego Ser326Cys genu *hOGG1* – model recesywny



Rycina 20. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na NDRP w zależności od wariantu polimorficznego Ser326Cys genu *hOGG1* – model dominujący



Rycina 21. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na NDRP w zależności od wariantu polimorficznego Ser326Cys genu *hOGG1* model addytywny

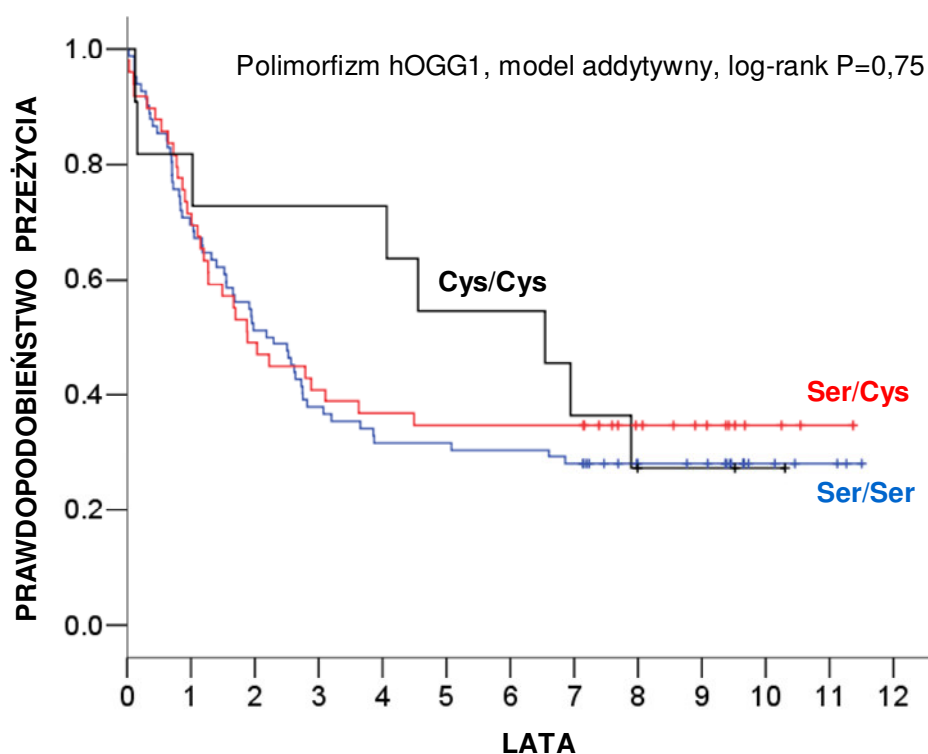


Tabela 24. Występowanie wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* a czas przeżycia

| | Mediana OS [lata] | 95% CI [lata] | Log-rank (P) |
|------------------|-------------------|---------------|--------------|
| Cała grupa | 2,2 | 1,6-2,9 | |
| Model recesywny | | | |
| Cys/Cys | 6,5 | 3,4-9,7 | 0,58 |
| Ser/Cys+Ser/Ser | 2,0 | 1,3-2,7 | |
| Model dominujący | | | |
| Cys/Cys+Ser/Cys | 2,2 | 0,7-3,8 | 0,49 |
| Ser/Ser | 2,2 | 1,4-3,0 | |
| Model addytywny | | | |
| Cys/Cys | 6,5 | 3,4-9,7 | 0,75 |
| Ser/Cys | 1,9 | 1,1-2,6 | |
| Ser/Ser | 2,2 | 1,4-3,0 | |

6.1.5. Zależność pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* i mutacji w genie *TP53*

U 75 chorych na NDRP mutacje oznaczono za pomocą metody SSCP. W grupie tej mutacje w egzonach 5.-8. wykryto u 25 chorych (33,3%). We wszystkich przypadkach obecność mutacji potwierdzono sekwencjonowaniem. Przy użyciu metody bezpośredniego sekwencjonowania mutacje wykryto u 26 (38,8%) spośród 67 chorych. Razem w całej grupie chorych (n=142) wykryto 51 mutacji genu *TP53* (35,9%). Transwersję G→T stwierdzono u 9 chorych (17,6% wszystkich mutacji), z czego 7 mutacji miało charakter zmiany sensu (*missense*), a 2 stanowiły mutacje „milczące” (*silent*).

U homozygot serynowych stwierdzono 27 mutacji (33%), u heterozygot - 22 (45%), a u homozygot cysteinowych – 2 (18%). Nie stwierdzono związku pomiędzy występowaniem określonego wariantu polimorficznego Ser326Cys genu *hOGG1* a częstością występowania mutacji w genie *TP53*.

Transwersję G→T stwierdzono u 6 chorych z wariantem polimorficznym Ser/Ser i u 3 chorych z wariantem polimorficznym Ser/Cys. U homozygot Cys/Cys nie stwierdzono żadnej transwersji G→T. Nie stwierdzono związku pomiędzy występowaniem określonego wariantu polimorficznego Ser326Cys genu *hOGG1* a częstością występowania transwersji G→T (tabela 25).

Tabela 25. Współwystępowanie wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* i mutacji w genie *TP53*

| Cecha | Wariant Ser/Ser n (%) | Wariant Ser/Cys n (%) | Wariant Cys/Cys n (%) | p |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| Mutacje <i>TP53</i> | | | | |
| Nie | 55 (67%) | 27 (55%) | 9 (82%) | 0,170 |
| Tak | 27 (33%) | 22 (45%) | 2 (18%) | |
| Transwersja G→T | | | | |
| Nie | 76 (93%) | 46 (94%) | 11 (100%) | 0,644 |
| Tak | 6 (7%) | 3 (6%) | 0 (0%) | |

6.2. Polimorfizm SNP309 genu *MDM2*

6.2.1. Częstość występowania wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* u chorych na NDRP i w grupie kontrolnej

Rozkład wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* określono u 132 chorych na NDRP (93%) oraz u 253 osób z grupy kontrolnej (91%). W grupie chorych najczęściej występował genotyp T/G (45,5%), podczas gdy w grupie kontrolnej – genotyp T/T (47,4%). Częstość występowania genotypu G/G wynosiła 13,6% w grupie chorych i 6,7% w grupie kontrolnej ($p=0,068$). Częstość występowania allelu G wynosiła 36,36% w grupie chorych i 29,6% w grupie kontrolnej ($p=0,061$). W tabeli 26 przedstawiono częstość poszczególnych wariantów polimorficznych i alleli w badanych grupach.

Tabela 26. Rozkład wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* w grupie chorych na NDRP i w grupie kontrolnej

| SNP309 | Chorzy | Grupa kontrolna | P |
|-------------------|------------|-----------------|-------|
| T/T (%) | 54 (40,9%) | 120 (47,4%) | 0,068 |
| T/G (%) | 60 (45,5%) | 116 (45,8%) | |
| G/G (%) | 18 (13,6%) | 17 (6,7 %) | |
| Częstość allelu G | 36,36 % | 29,6 % | 0,061 |

Nie stwierdzono istotnych odchyień rozkładu genotypów od rozkładu określonego przez test równowagi Hardy'ego-Weinberga w grupie kontrolnej ($p= 0,133$).

6.2.2. Polimorfizm SNP309 genu *MDM2* w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP

Ryzyko zachorowania na NDRP w odniesieniu do wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* rozpatrywano wykorzystując trzy modele porównawcze: recesywny, dominujący i addytywny. Przyjmując wariant surowy (nieskorygowany) współczynnik OR dla wariantu polimorficznego G/G w modelu recesywnym wynosił 2,19, a w modelu addytywnym 2,35; były to różnice znamienne (odpowiednio $p=0,028$ i $p=0,023$). Po skorygowaniu względem płci, wieku i historii palenia tytoniu wzrost względnego ryzyka zachorowania na NDRP dla homozygot G/G w modelu addytywnym był znamieny (OR=2,27; 95% CI=1,04-4,93) (tabela 27 i tabela 28).

Tabela 27. Analiza współczynników ryzyka (OR) i 95% zakresów ufności (95% CI) dla polimorfizmu SNP309 genu *MDM2*. Model surowy (nieskorygowany)

| | OR (95% CI) | P |
|--------------------------------------|---------------------|--------------|
| Model recesywny G/G vs G/T + T/T | 2,19 (1,09-4,41) | 0,028 |
| Model dominujący G/G + G/T vs T/T | 1,30 (0,85-1,99) | 0,222 |
| Model addytywny G/T vs T/T | 1,15 (0,73-1,80) | 0,542 |
| G/G vs T/T | 2,35 (1,13-4,91) | 0,023 |

Tabela 28. Analiza współczynników ryzyka (OR) i 95% zakresów ufności (95% CI) dla polimorfizmu SNP309 genu *MDM2*. Model skorygowany względem płci, wieku i historii palenia tytoniu

| | OR (95% CI) | P |
|--------------------------------------|---------------------|--------------|
| Model recesywny G/G vs G/T + T/T | 2,05 (0,98-4,29) | 0,056 |
| Model dominujący G/G + G/T vs T/T | 1,35 (0,86-2,12) | 0,188 |
| Model addytywny G/T vs T/T | 1,21 (0,76-1,94) | 0,422 |
| G/G vs T/T | 2,27 (1,04-4,93) | 0,039 |

6.2.3. Kliniczna wartość polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* u chorych na NDRP

W analizie zależności pomiędzy wariantami polimorficznymi SNP309 genu *MDM2* a cechami klinicznymi uwzględniono płeć i wiek chorych, palenie tytoniu, postać histologiczną raka, cechę T i cechę N w skali pTNM oraz stopień zróżnicowania guza. Nie wykazano zależności pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych a wyżej wymienionymi cechami klinicznymi (tabela 29).

Tabela 29. Analiza związku pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* a wybranymi cechami klinicznymi chorych na NDRP

| Cecha | Wariant T/T n (%) | Wariant T/G n (%) | Wariant G/G n (%) | P |
|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------|
| Płeć | | | | |
| Mężczyźni | 48 (89%) | 55 (92%) | 14 (78%) | 0,265 |
| Kobiety | 6 (11%) | 5 (8%) | 4 (22%) | |
| Wiek | | | | |
| Mediana | 63 | 62 | 59 | 0,819 |
| Zakres | 43-75 | 48-78 | 43-75 | |
| Palenie tytoniu | | | | |
| Nie | 2 (4%) | 4 (7%) | 3 (17%) | 0,181 |
| Tak | 49 (96%) | 56 (93%) | 15 (83%) | |
| Postać histologiczna raka | | | | |
| SCC | 37 (68%) | 42 (70%) | 9 (50%) | 0,124 |
| AC | 12 (22%) | 16 (27%) | 5 (28%) | |
| LCC | 3 (6%) | 0 (0%) | 3 (17%) | |
| mieszany | 2 (4%) | 2 (3%) | 1 (5%) | |
| pT | | | | |
| T1 | 0 (0%) | 6 (10%) | 3 (17%) | 0,138 |
| T2 | 35 (65%) | 33 (55%) | 12 (67%) | |
| T3 | 15 (28%) | 15 (25%) | 2 (11%) | |
| T4 | 4 (7%) | 6 (10%) | 1 (5%) | |
| pN | | | | |
| N0 | 31 (58%) | 28 (47%) | 9 (50%) | 0,805 |
| N1 | 12 (22%) | 15 (25%) | 5 (28%) | |
| N2 | 11 (20%) | 17 (28%) | 4 (22%) | |
| Stopień zróżnicowania | | | | |
| G1 | 7 (13%) | 7 (12%) | 1 (6%) | 0,348 |
| G2 | 35 (66%) | 36 (62%) | 15 (88%) | |
| G3 | 11 (21%) | 15 (26%) | 1 (6%) | |

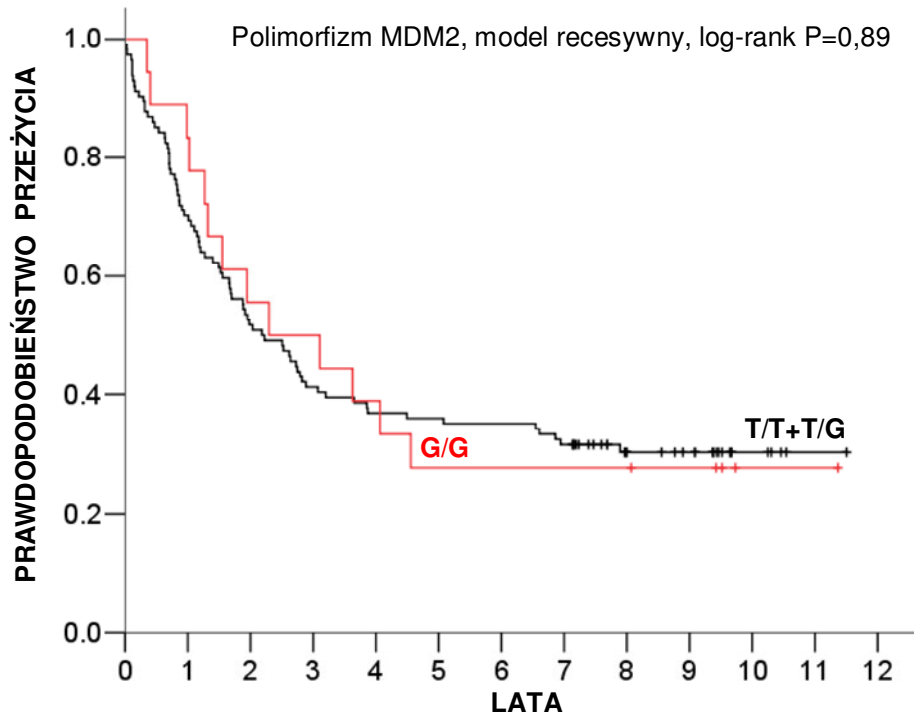
6.2.4. Rokownicza wartość polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* u chorych na NDRP

Związek pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* a czasem całkowitego przeżycia rozpatrywano wykorzystując trzy modele porównawcze: recesywny, dominujący i addytywny. Nie stwierdzono związku pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych a czasem całkowitego przeżycia w żadnym z wymienionych wyżej modeli (tabela 30) (ryciny 22-24). Nie stwierdzono także związku pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych a medianą czasu przeżycia chorych (tabela 31).

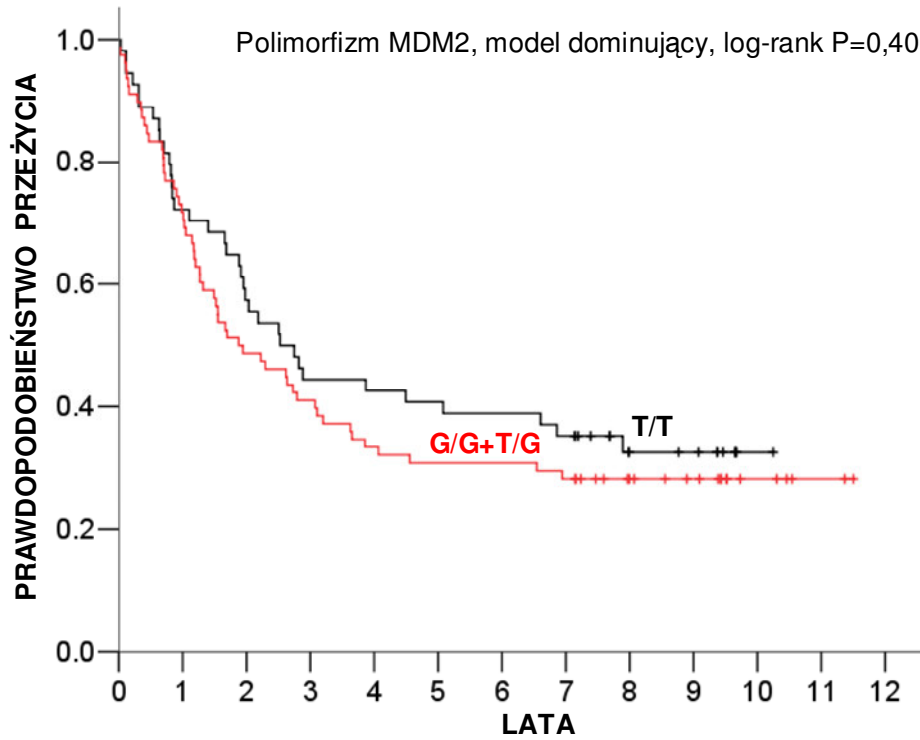
Tabela 30. Polimorfizm SNP309 genu *MDM2* - analiza czasu przeżycia (model nieskorygowany i skorygowany o płeć, wiek i stopień zaawansowania)

| | HR_{sur} (95% CI) | P | HR_{koryg} (95% CI) | P |
|--------------------------------------|--|----------|--|----------|
| Model recesywny G/G vs G/T + T/T | 0,96 0,53-1,73 | 0,892 | 1,11 0,62-2,01 | 0,728 |
| Model dominujący G/G + G/T vs T/T | 1,20 0,79-1,82 | 0,403 | 1,17 0,75-1,79 | 0,454 |
| Model addytywny G/T vs T/T | 1,24 0,80-1,93 | 0,344 | 1,17 0,75-1,82 | 0,500 |
| G/G vs T/T | 1,07 0,57-2,02 | 0,828 | 1,20 0,64-2,27 | 0,573 |

Rycina 22. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na NDRP w zależności od wariantu polimorficznego SNP309 genu *MDM2* – model recesywny



Rycina 23. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na NDRP w zależności od wariantu polimorficznego SNP309 genu *MDM2* – model dominujący



Rycina 24. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na NDRP w zależności od wariantu polimorficznego SNP309 genu *MDM2* – model addytywny

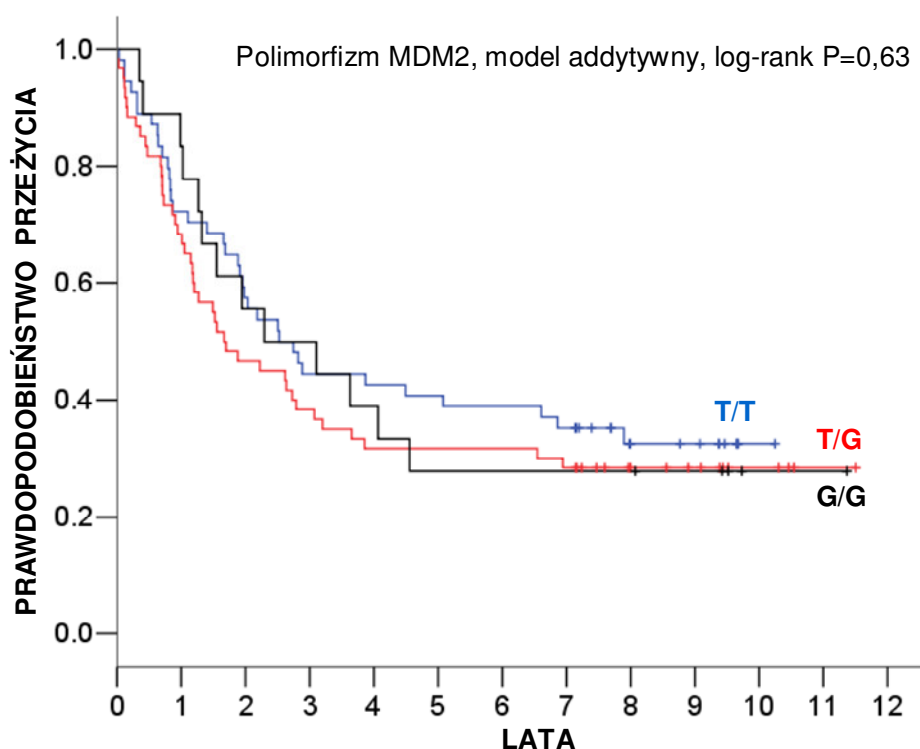


Tabela 31. Występowanie wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* a czas przeżycia

| | Mediana OS [lata] | 95% CI [lata] | Log-rank (P) |
|------------------|-------------------|---------------|--------------|
| Cała grupa | 2,2 | 1,6-2,9 | |
| Model recesywny | | | |
| G/G | 2,3 | 0-4,7 | 0,89 |
| T/T+T/G | 2,2 | 1,4-2,9 | |
| Model dominujący | | | |
| G/G+T/G | 1,9 | 0,7-3,0 | 0,40 |
| T/T | 2,5 | 1,5-3,5 | |
| Model addytywny | | | |
| G/G | 2,3 | 0-4,7 | 0,63 |
| T/G | 1,7 | 0,7-2,6 | |
| T/T | 2,5 | 1,5-3,5 | |

6.2.5. Zależność pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* i mutacji w genie *TP53*

U homozygot T/T stwierdzono 19 mutacji (35%), u heterozygot - 22 (37%), a u homozygot G/G – 7 (39%). Nie stwierdzono związku pomiędzy występowaniem określonego wariantu polimorficznego SNP309 genu *MDM2* a częstością występowania mutacji w genie *TP53* (tabela 32).

Tabela 32. Współwystępowanie wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* i mutacji w genie *TP53*

| Cecha | Wariant T/T n (%) | Wariant T/G n (%) | Wariant G/G n (%) | P |
|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------|
| Mutacje <i>TP53</i> | | | | |
| Nie | 35 (65%) | 38 (63%) | 11 (61%) | 0,959 |
| Tak | 19 (35%) | 22 (37%) | 7 (39%) | |

6.3. Współwystępowanie polimorfizmów Ser326Cys genu *hOGG1* i SNP309 genu *MDM2* w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP

W niniejszej pracy analizowano ryzyko zachorowania na NDRP w zależności od obu polimorfizmów wykorzystując wskaźnik ryzyka (*ang. risk score*).

Ze względu na małą liczbę osób z najwyższym wskaźnikiem ryzyka (n=4), grupę tę połączono z grupą o dwóch czynnikach ryzyka.

Rozkład cech ryzyka przedstawiono w tabeli 33.

Tabela 33. Rozkład cech ryzyka w badanej grupie

| Wskaźnik ryzyka | Chorzy | Grupa kontrolna |
|-----------------|------------|-----------------|
| 0 | 66 (50,0%) | 189 (74,7%) |
| 1 | 49 (37,1%) | 53 (20,9%) |
| 2+3 | 17 (12,9%) | 11 (4,3%) |

Tabela 34. Analiza współczynników ryzyka (OR) i 95% zakresów ufności (95% CI) w zależności od wskaźnika ryzyka. Model surowy (nieskorygowany)

| Wskaźnik ryzyka | OR (95% CI) | p |
|-----------------|---------------------|-------------------|
| 0 | 1,00 - | - |
| 1 | 2,65 (1,64-4,27) | <0,0001 |
| 2+3 | 4,42 (1,97-9,93) | <0,0001 |

Tabela 35. Analiza współczynników ryzyka (OR) i 95% zakresów ufności (95% CI) w zależności od wskaźnika ryzyka. Model skorygowany

| Wskaźnik ryzyka | OR (95% CI) | p |
|-----------------|---------------------|-------------------|
| 0 | 1,00 - | - |
| 1 | 2,65 (1,61-4,37) | <0,0001 |
| 2+3 | 4,01 (1,75-9,21) | <0,0001 |

Analiza współczynników ryzyka w zależności od wskaźnika ryzyka wykazała, że ryzyko zachorowania na NDRP rośnie proporcjonalnie wraz ze wzrostem wskaźnika ryzyka.

Następnie oceniono łączną wartość predykcyjną analizy genotypów dla ryzyka zachorowania na raka płuca. Do analizy włączone zostały model addytywny polimorfizmu genu *hOGG1* i model recesywny polimorfizmu genu *MDM2* (na podstawie analizy jednoczynnikowej) (tabela 36).

Tabela 36. Model wieloczynnikowy skorygowany

| | OR (95% CI) | P |
|-------------------------|-----------------------|-------------------|
| hOGG1 – model addytywny | | |
| Cys/Ser vs. Ser/Ser | 3,01 (1,81 – 5,02) | p<0,001 |
| Cys/Cys vs. Ser/Ser | 3,43 (1,24 – 9,43) | p=0,017 |
| MDM2 – model recesywny | | |
| G/G vs. G/T+T/T | 1,84 (0,86-3,94) | p=0,12 |

Model wskazuje, że genotypowanie *MDM2* do genotypowania *hOGG1* nie dodaje wartości predykcyjnej dla oceny ryzyka zachorowania na raka płuca.

7. DYSKUSJA

7.1. Polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1*

7.1.1. Częstość występowania wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* u chorych na NDRP i w grupie kontrolnej

Jednym z celów pracy była ocena częstości występowania wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* w grupie chorych na NDRP i wśród osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną. Różnice w częstości występowania wariantów polimorficznych i rozkład alleli pomiędzy obiema grupami były znamienne ($p < 0,001$). Stwierdzono znamienne wyższą częstość występowania allelu Cys w grupie chorych na NDRP w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio 24,95% i 11,9%; $p < 0,001$).

Częstość występowania wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1*, zarówno wśród osób zdrowych, jak i wśród chorych na NDRP w publikacjach różnych autorów jest zróżnicowana (tabela 37). Istotnym czynnikiem wpływającym na rozkład wariantów polimorficznych jest rasa. Stwierdzono znaczne różnice w częstości występowania poszczególnych wariantów polimorficznych między rasą kaukaską (białą) a rasą żółtą. Wśród osób zdrowych rasy kaukaskiej (białej) częstość występowania homozygot serynowych waha się w granicach 52-79%, a homozygot cysteinowych 1-9%. Wśród osób zdrowych rasy żółtej wartości te wynoszą odpowiednio 15-47% i 13-38%. Porównując obie te populacje można stwierdzić, że liczba nosicieli allelu Cys jest wyraźnie wyższa wśród osób rasy żółtej w porównaniu do osób rasy białej.

Wbrew przewidywaniom, odsetki poszczególnych genotypów uzyskane w niniejszej pracy różnią się od wyników jakie uzyskali Hung i wsp. (59). Autorzy ci, przeprowadzili duże, wielośrodkowe badanie w sześciu krajach europejskich (w tym w Polsce), obejmujące 2155 chorych na raka płuca i 2163 osób zdrowych rasy kaukaskiej. W porównaniu z tym badaniem częstość występowania allelu Cys w populacji polskiej uzyskana w niniejszej

analizie jest wyraźnie mniejsza (odpowiednio 20,5% i 11,5%). Wydaje się, że ta różnica wynikać może ze wspólnej oceny wyników z sześciu krajów europejskich (15 ośrodków) w tym badaniu; ponadto badanie w Polsce było przeprowadzone wśród chorych na NDRP z okolic Warszawy i Łodzi. Wyniki niniejszego badania różnią się także w porównaniu do populacji duńskiej i niemieckiej (częstość występowania allelu Cys odpowiednio 24,5%; 22,5%).

Podobne różnice w rozkładzie wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGGI* pomiędzy rasą kaukaską (białą) i rasą żółtą można stwierdzić wśród chorych na raka płuca. Wśród chorych rasy żółtej częstość występowania allelu Cys jest wyraźnie większa w porównaniu z chorymi z rasy kaukaskiej.

Hu YC i wsp. ocenili w swojej pracy częstość występowania wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGGI* wśród osób amerykańskiej rasy czarnej chorych na NDRP. Dotychczas jest to jedyne doniesienie dotyczące tego zagadnienia wśród osób rasy czarnej. Częstość występowania allelu Cys w tej grupie chorych na NDRP był najniższy w porównaniu do innych populacji i wynosił 13,5%.

Częstość występowania wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGGI* wśród chorych na NDRP w populacji polskiej oceniona w niniejszej pracy jest najbardziej zbliżona do częstości wśród chorych na raka płuca z amerykańskiej rasy białej opisywanej przez Parka J i wsp. oraz Le Marchanda L i wsp., jakkolwiek odsetek homozygot cysteinowych jest w tej grupie najwyższy biorąc pod uwagę rasę kaukaską (białą). Wydaje się zatem, że pod względem genotypowym polska populacja jest najbardziej zbliżona do amerykańskiej rasy białej (23, 37, 98).

Tabela 37. Częstość wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* w populacjach z różnych regionów geograficznych

| Populacja | Zdrowi | | | Chorzy na raka płuca | | | Pozycja piśmiennictwa |
|---------------------------------------|------------|------------|-----------|----------------------|------------|-----------|------------------------|
| | Ser/Ser | Ser/Cys | Cys/Cys | Ser/Ser | Ser/Cys | Cys/Cys | |
| niemiecka | 57% | 41% | 2% | 65% | 30% | 5% | 129 |
| rasa kaukaska (europejska mieszana) | 63% | 33% | 4% | 65% | 31% | 4% | 59 |
| amerykańska rasa biała | 62% | 33% | 5% | 62% | 31% | 7% | 73 |
| amerykańska rasa biała | 73% | 25% | 2% | 56% | 36% | 7% | 98 |
| amerykańska rasa biała | - | - | - | 60% | 38% | 2% | 56 |
| amerykańska rasa biała | 55% | 36% | 9% | - | - | - | 135 |
| amerykańska rasa biała | 74% | 25% | 1% | - | - | - | 23 |
| amerykańska rasa biała | 75% | 23% | 2% | - | - | - | 37 |
| amerykańska rasa biała | 62% | 32% | 6% | - | - | - | 138 |
| duńska | 56% | 39% | 5% | - | - | - | 123 |
| duńska | 52% | 40% | 8% | - | - | - | 124 |
| polska | 79% | 19% | 2% | 58% | 34% | 8% | niniejsza praca |
| japońska | 33% | 49% | 17% | 31% | 41% | 28% | 73 |
| japońska | 28% | 49% | 23% | 29% | 51% | 20% | 63 |
| japońska | 36% | 48% | 17% | 36% | 42% | 20% | 70 |
| japońska | 33% | 43% | 24% | 27% | 53% | 19% | 115 |
| japońska | 34% | 48% | 18% | - | - | - | 27 |
| Brazylijczycy pochodzenia japońskiego | 35% | 44% | 21% | - | - | - | 49 |
| chińska | 47% | 39% | 14% | 31% | 52% | 17% | 71 |
| chińska | 34% | 53% | 13% | - | - | - | 134 |
| chińska | 15% | 60% | 25% | - | - | - | 118 |
| chińska | 38% | 45% | 17% | - | - | - | 50 |
| koreańska | 17% | 55% | 28% | - | - | - | 27 |
| koreańska | 21% | 53% | 26% | - | - | - | 67 |
| tajwańska | 16% | 46% | 38% | - | - | - | 26 |
| azjatycka (mieszana) | 32% | 54% | 14% | 35% | 48% | 17% | 114 |
| hawajska | 30% | 50% | 20% | 20% | 41% | 39% | 73 |
| Brazylijczycy | 60% | 36% | 4% | - | - | - | 49 |
| Afroamerykanie | - | - | - | 83% | 7% | 10% | 56 |

7.1.2. Polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP

W niniejszym badaniu analizowano związek pomiędzy ryzykiem zachorowania na NDRP a polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* według trzech modeli genetycznych. We wszystkich trzech modelach wykazano wpływ polimorfizmu na ryzyko zachorowania na raka. Najlepszym modelem obrazującym ten wzrost w zależności od liczby alleli Cys jest model addytywny. Stwierdzono, że ryzyko zachorowania na NDRP rośnie proporcjonalnie wraz z liczbą alleli Cys i dla heterozygot jest ponad 2,5-krotnie większe (OR=2,70; 95%CI=1,67-4,37), a dla homozygot cysteinowych niemal czterokrotnie większe (OR=3,78; 95%CI=1,39-10,28) w porównaniu do homozygot serynowych.

W wielu badaniach epidemiologicznych, autorzy podejmowali analizę zależności pomiędzy polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* a ryzykiem zachorowania na różne typy nowotworów (tabela 38).

Znamiennie zwiększone ryzyko związane z obecnością allelu Cys stwierdzono dla raka nosogardzieli (26, 37), przełyku (134) i prostaty (23, 135). Natomiast w innych doniesieniach, takiej zależności nie stwierdzono dla raka żołądka (49, 118), nosogardzieli (138), przełyku (50), jelita grubego (67), skóry (124) oraz piersi (27, 123).

Tabela 38. Związek pomiędzy polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* a ryzykiem zachorowania na raka w innej lokalizacji niż płuca (przegląd piśmiennictwa)

| Umiejscowienie guza | Populacja | Chorzy | Kontrole | OR (95% CI) | Pozycja piśmiennictwa |
|---------------------|---------------------------------------|--------|----------|---|-----------------------|
| Prostata | kaukaska | 199 | 174 | 3,2 (1,2-8,7) ^b | 135 |
| Prostata | kaukaska | 84 | 252 | 1,8 (1,01-3,3) ^a 7,8 (1,7-36,2) ^b 2,1 (1,2-3,8) ^c | 23 |
| Żołądek | Brazylijczycy pochodzenia japońskiego | 58 | 127 | 1,1 (0,5-2,2) ^a 0,8 (0,3-2,0) ^b 1,0 (0,5-1,9) ^c | 49 |
| Żołądek | Brazylijczycy | 208 | 205 | 0,9 (0,6-1,3) ^a 1,0 (0,4-2,8) ^b 0,8 (0,6-1,3) ^c | 49 |
| Żołądek | chińska | 101 | 198 | 0,8 (0,4-1,6) ^a 0,7 (0,3-1,6) ^b | 118 |
| Przełyk | chińska | 196 | 201 | 1,9 (1,3-2,6) ^d | 134 |
| Przełyk | chińska | 410 | 479 | 1,0 (0,7-1,4) ^a 1,1 (0,7-1,6) ^b | 50 |
| Nosogardziel | kaukaska | 167 | 331 | 1,6 (1,04-2,6) ^a 4,1 (1,3-13) ^b | 37 |
| Nosogardziel | tajwańska | 333 | 283 | 1,8 (1,1-2,9) ^a 1,4 (0,9-2,4) ^b 1,6 (1,0-2,6) ^c | 26 |
| Nosogardziel | kaukaska | 706 | 1196 | 0,9 (0,8-1,1) ^a 1,0 (0,6-1,5) ^b 0,9 (0,8-1,1) ^c | 138 |
| Jelito grube | koreańska | 125 | 247 | 1,1 (0,6-2,0) ^a 1,2 (0,6-2,3) ^b | 67 |
| Pierś | koreańska | 265 | 284 | 0,9 (0,6-1,5) ^a 1,2 (0,7-2,0) ^b | 27 |
| Pierś | japońska | 201 | 184 | 1,2 (0,8-1,9) ^a 1,7 (0,9-3,0) ^b | 27 |
| Pierś | kaukaska | 425 | 434 | 0,8 (0,6-1,1) ^a 1,0 (0,5-1,9) ^b | 123 |
| Skóra | kaukaska | 319 | 319 | 1,0 (0,7-1,4) ^a 1,1 (0,6-2,0) ^b | 124 |

^a Ser/Cys vs Ser/Ser

^b Cys/Cys vs Ser/Ser

^c (Cys/Cys + Ser/Cys) vs Ser/Ser

^d Cys/Cys vs (Ser/Cys + Ser/Ser)

Dotychczas ukazało się osiem publikacji, w których autorzy oceniali związek pomiędzy ryzykiem zachorowania na raka płuca a polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* (tabela 39). W trzech badaniach stwierdzono istotnie zwiększone ryzyko zachorowania na raka płuca związane z tym polimorfizmem (71, 73, 98), podczas gdy w pięciu badaniach nie stwierdzono takiego związku (59, 63, 114, 115, 129).

Najbardziej zbliżone wyniki do wyników niniejszego badania uzyskali Park J i wsp. (98), w analizie obejmującej jednolitą etnicznie grupę 179 chorych na raka płuca amerykańskiej rasy białej (w tym 160 chorych na NDRP). Grupę kontrolną stanowiło 350 zdrowych osób. Autorzy ci stwierdzili, że ryzyko zachorowania na NDRP dla heterozygot Ser/Cys jest dwukrotnie większe, a dla homozygot cysteinowych niemal czterokrotnie większe w porównaniu do homozygot serynowych.

Zwiększone ryzyko zachorowania na raka płuca w zależności od polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* wykazali także Le Marchand L i wsp. (73), którzy objęli badaniem 298 chorych na raka płuca i 405 osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną. Grupy te były niejednolite etnicznie i obejmowały populację japońską, hawajską i kaukaską (amerykańska rasa biała). Największe, ponad trzykrotne, ryzyko zachorowania na raka płuca stwierdzono dla homozygot cysteinowych w populacji hawajskiej. Nieco mniejsze, bo ponad dwukrotnie zwiększone ryzyko zachorowania na raka płuca stwierdzono u chorych rasy żółtej (populacja japońska) (Cys/Cys vs (Ser/Cys + Ser/Ser)). W grupie chorych amerykańskiej rasy białej nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy ryzykiem zachorowania na raka płuca a polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1*. Podobne wyniki, jak Le Marchand i wsp., wśród chorych rasy żółtej (populacja chińska) uzyskali Lan i wsp. (71), w badaniu obejmującym 118 chorych na raka płuca i 119 osób zdrowych. Wykazali oni dwukrotnie zwiększone ryzyko zachorowania na raka płuca związane z polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* ((Cys/Cys + Ser/Cys) vs Ser/Ser).

Tabela 39. Związek pomiędzy polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* a ryzykiem zachorowania na raka płuca (przegląd piśmiennictwa)

| Populacja | Chorzy | Kontrole | OR (95% CI) | Pozycja piśmiennictwa |
|-------------------------------------|--------|----------|--|-----------------------|
| azjatycka (mieszana) | 241 | 197 | 0,6 (0,4-1,1) ^a 1,3 (0,6-2,6) ^b 1,7 (0,9-3,2) ^d | 114 |
| niemiecka | 105 | 105 | 2,2 (0,4-11,8) ^b 0,7 (0,4-1,3) ^c | 129 |
| amerykańska rasa biała | 126 | 159 | 0,6 (0,3-1,2) ^a 1,6 (0,5-6,1) ^b 1,9 (0,5-6,8) ^d | 73 |
| japońska | 97 | 150 | 0,8 (0,4-1,6) ^a 2,0 (0,9-4,6) ^b 2,2 (1,1-4,7)^d | 73 |
| hawajska | 75 | 96 | 1,1 (0,4-3,2) ^a 3,6 (1,0-11,9)^b 3,4 (1,3-8,9)^d | 73 |
| japońska | 138 | 241 | 1,1 (0,6-1,8) ^a 0,8 (0,4-1,5) ^b | 63 |
| japońska | 198 | 152 | 1,3 (0,8-2,2) ^a 0,9 (0,48-1,7) ^b | 115 |
| chińska | 118 | 119 | 2,0 (1,1-3,6)^a 1,8 (0,8-4,1) ^b 1,9 (1,1-3,3)^c | 71 |
| amerykańska rasa biała | 179 | 350 | 2,0 (1,3-3,1)^a 3,9 (1,4-11,1)^b 2,2 (1,4-3,3)^c | 98 |
| rasa kaukaska (europejska mieszana) | 2155 | 2163 | 0,9 (0,8-1,1) ^a 1,3 (0,9-1,9) ^b | 59 |
| polska | 142 | 277 | 2,7 (1,7-4,4)^a 3,8 (1,4-10,3)^b 2,8 (1,8-4,5)^c 2,8 (1,04-7,6)^d | niniejsza praca |

^a Ser/Cys vs Ser/Ser

^b Cys/Cys vs Ser/Ser

^c (Cys/Cys + Ser/Cys) vs Ser/Ser

^d Cys/Cys vs (Ser/Cys + Ser/Ser)

Natomiast Hung i wsp. w dużym, wieloośrodkowym badaniu przeprowadzonym w sześciu krajach europejskich (Rumunia, Węgry, Rosja, Słowacja, Czechy i Polska) nie wykazali związku pomiędzy ryzykiem zachorowania na NDRP a polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* (59). Badanie to obejmowało 2155 chorych na raka płuca i 2163 osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną i do tej pory było jedynym badaniem o wystarczająco dużej mocy statystycznej. Aczkolwiek rozpatrując oddzielnie poszczególne typy histopatologiczne raka, autorzy ci wykazali, że ryzyko zachorowania na gruczolakoraka jest niemal dwukrotnie większe dla nosicieli wariantu Cys/Cys (OR=1,66; 95% CI=1,04-2,66). Wynik ten nie potwierdził wcześniejszych doniesień przeprowadzonych wśród chorych rasy żółtej (63, 114, 115), w których autorzy nie stwierdzili zależności pomiędzy ryzykiem zachorowania na gruczolakoraka a polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1*. Natomiast Sugimura i wsp. wykazali, że ryzyko zachorowania na raka płaskonabłonkowego jest trzykrotnie większe dla homozygot Cys/Cys vs. Ser/Ser i Ser/Cys (OR=3,01; 95% CI=1,33-6,83), aczkolwiek rozpatrując wszystkie typy histopatologiczne raka płuca łącznie, nie stwierdzili istotnej zależności. Wikman H i wsp. również nie wykazali związku pomiędzy ryzykiem zachorowania na NDRP a polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* (129).

Bardzo interesujące wyniki uzyskali Paz-Elizur T i wsp. (102), którzy badali zależność pomiędzy aktywnością białka hOGG1 a ryzykiem zachorowania na NDRP. Analizą objęli 68 chorych na NDRP i 68 osób zdrowych rasy kaukaskiej. Autorzy wykazali, że średnia aktywność białka hOGG1 u chorych na NDRP była znamienne niższa niż u kontroli (odpowiednio 5,8 i 7,1 U/ μ g), a ryzyko zachorowania na NDRP było ponad pięciokrotnie większe u chorych z niską aktywnością białka hOGG1 (\leq 7,2 U/ μ g). Ostatnie badania wskazują, że wariant polimorficzny Cys/Cys wiąże się z obniżoną aktywnością naprawczą wobec 8-oxoG (136). Zatem wyniki przedstawione przez Paz-Elizur i wsp. mogą potwierdzać istotny wpływ polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* na ryzyko zachorowania na NDRP.

Należy jednak pamiętać, że na aktywność białka ma wpływ szereg czynników. Oprócz uwarunkowań genetycznych, są to: ekspresja białka, jego potranslacyjne modyfikacje oraz obecność naturalnych inhibitorów i aktywatorów. Z drugiej strony analiza molekularna polimorfizmu (za pomocą PCR lub sekwencjonowania) jest dużo mniej skomplikowaną procedurą niż ocena aktywności białka, gdzie dodatkowo głównym ograniczeniem jest konieczność izolacji limfocytów z krwi obwodowej w ciągu 24 godzin. To mogłoby ograniczać w dużym stopniu przydatność wspomianej metody jako badania przesiewowego.

W wielu wymienionych powyżej doniesieniach podejmowano również analizę związku pomiędzy ryzykiem zachorowania na raka płuca a polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* w zależności od nałogu palenia tytoniu. Uszkodzenie DNA (8-oxoG), które jest rozpoznawane i usuwane przez białko hOGG1, powstaje w wyniku działania reaktywnych form tlenu zawartych między innymi w dymie tytoniowym (10, 11, 25, 76, 77). Zatem u palaczy tytoniu z obniżoną aktywnością białka hOGG1 (wariant polimorficzny Cys/Cys) mutacje powstają częściej niż u palaczy tytoniu z normalną aktywnością białka hOGG1 lub u osób niepalących z obniżoną aktywnością hOGG1. Zatem podjęcie tego typu badań wydaje się być bardzo uzasadnione. Interesujące wyniki otrzymali Park J i wsp. (98), którzy wykazali, że ryzyko zachorowania na raka płuca znacznie wzrasta wraz z liczbą wypalonych papierosów mierzoną w paczkolatach, osiągając wartość ośmiokrotną dla nałogowych palaczy tytoniu (powyżej 34 paczkołat), którzy byli nosicielami polimorficznego wariantu Cys/Cys (OR=8,1; 95%CI=1,7-39,1). Badanie to potwierdziło wcześniejsze doniesienie Sugimury H i wsp. (114), w którym autorzy wykazali, że ryzyko zachorowania na raka płuca u nałogowych palaczy (powyżej 40 paczkołat), którzy posiadali wariant polimorficzny Cys/Cys było dwukrotnie większe, aczkolwiek wartość ta nie była statystycznie znamienne (OR=2,33; 95%CI=0,77-7,09). W wymienionym wcześniej doniesieniu, Paz-Elizur T i wsp. (102) wykazali, że względne ryzyko zachorowania na raka płuca u palaczy z obniżoną aktywnością białka

hOGG1 wynosząca 6,0 U/ μ g lub 4,0 U/ μ g jest odpowiednio 34- lub 124-razy większe niż u osób niepalących z aktywnością białka hOGG1 wynoszącą 7,0 U/ μ g. Z drugiej strony, u osób niepalących z obniżoną aktywnością białka hOGG1 (wartości jak wyżej) względne ryzyko zachorowania na raka płuca było już tylko 1,9- lub 7,0-razy większe niż u osób niepalących z aktywnością białka hOGG1 wynoszącą 7,0 U/ μ g. Wyniki te jednak należy traktować z pewną ostrożnością ze względu na małą liczebność porównywanych ze sobą grup. W innych doniesieniach nie stwierdzono istotnych różnic we wzroście ryzyka zachorowania na raka płuca dla palących vs niepalących oraz w zależności od liczby wypalonych papierosów mierzonej w paczkolatach (59, 63, 73, 71, 115, 129).

W niniejszym badaniu nie wykazano zależności pomiędzy częstością występowania wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* a ryzykiem zachorowania na NDRP w zależności od palenia tytoniu. W chwili zamknięcia bazy, na podstawie dokumentacji medycznej i wywiadów z żyjącymi chorymi liczbę paczolat określono u 99 na 142 chorych (70%). Analizę ograniczono więc, do podziału grupy chorych na palaczy tytoniu i osoby, które nigdy nie paliły.

Metaanaliza obejmująca 30 badań dotyczących zależności pomiędzy polimorfizmami w genach naprawczych (analizowano 29 polimorfizmów zlokalizowanych w 8 genach), a nowotworami o różnym umiejscowieniu (w tym płuco), wykazała, że polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* jest jednym z trzech polimorfizmów mających wpływ na ryzyko zachorowania na chorobę nowotworową (45). Podobnie, na podstawie metaanalizy obejmującej 116 badań dotyczących związku pomiędzy polimorfizmami w genach należących do grupy BER a ryzykiem zachorowania na różne nowotwory (w tym 22 doniesień dotyczących *hOGG1*), autorzy wykazali zwiększone ryzyko zachorowania na raka płuca wśród nosicieli genotypu Cys/Cys (OR=1,24; 95%CI=1,01-1,53). Analiza ta objęła 3253 chorych na raka płuca i 3371 osób zdrowych, stanowiących grupę kontrolną z 7 badań. Autorzy nie stwierdzili natomiast wpływu polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* na ryzyko

zachorowania na inne nowotwory. Wykazali ponadto, że na efekt tego polimorfizmu względem ryzyka zachorowania na nowotwory nie ma wpływu rasa (żółta vs. kaukaska) ani palenie tytoniu (60).

Podsumowując, dotychczasowe doniesienia pozwalają przypuszczać, że polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* może mieć wpływ na aktywność naprawczą białka hOGG1 i w konsekwencji na ryzyko zachorowania na różne nowotwory, zwłaszcza na raka płuca. Aczkolwiek wyniki dotychczasowych doniesień są niejednoznaczne. Może to wynikać z wielu czynników takich jak: niska moc statystyczna większości badań, wyniki fałszywie dodatnie, zróżnicowanie badanych populacji, nieuwzględnienie narażenia na dodatkowe czynniki środowiskowe oraz niepublikowanie tzw. „negatywnych” doniesień.

7.1.3. Kliniczna wartość polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* u chorych na NDRP

W niniejszej analizie wykazano istotne różnice w rozkładzie wariantów polimorficznych w zależności od cechy pN. Jednak wynik ten należy interpretować z ostrożnością. Nie stwierdzono w tej zależności trendu wraz ze wzrostem liczby alleli Cys. Nie wykazano zależności pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych a płcią, wiekiem, historią palenia tytoniu, postacią histologiczną raka, cechą pT oraz stopniem zróżnicowania guza. W badaniu obejmującym 141 chorych na NDRP, Hu i wsp. (56) nie stwierdzili związku pomiędzy częstością poszczególnych genotypów a wiekiem, płcią, historią palenia tytoniu, postacią histologiczną raka, stopniem zaawansowania choroby i zróżnicowaniem guza. Wykazali natomiast, że nadużywanie alkoholu ($\geq 1x$ dziennie) było częstsze wśród chorych z genotypem Ser/Ser, aczkolwiek różnica ta nie była statystycznie znamienne.

7.1.4. Rokownicza wartość polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* u chorych na NDRP

W niniejszej pracy nie wykazano wpływu polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* na przeżycie chorych na NDRP. Do tej pory ukazało się jedno doniesienie dotyczące rokowniczego znaczenia tego polimorfizmu u chorych na raka płuca (gruczolakoraka) (63). Autorzy tej pracy oceniali między innymi współczynnik OR dla genotypów Ser/Cys lub Cys/Cys w odniesieniu do okresu od rozpoznania i wykazali, że jest on wyższy w grupie chorych, u których rozpoznano raka płuca w okresie nie dłuższym niż 3 lata od włączenia do badania, niż wśród chorych o dłuższym przeżyciu, aczkolwiek różnica ta nie była znamienna statystycznie (odpowiednio: OR=1,72; 95%CI=0,88-3,39 i OR=0,64; 95%CI=0,36-1,14). Może to wskazywać, że genotyp Cys/Cys ma związek z gorszym rokowaniem, aczkolwiek obecna analiza nie potwierdziła tego przypuszczenia.

7.1.5. Zależność pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* i mutacji w genie *TP53*

W niniejszym badaniu nie stwierdzono związku pomiędzy polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* a częstością występowania mutacji w genie *TP53*.

Transwersję G→T stwierdzono u 6 chorych z wariantem polimorficznym Ser/Ser i u 3 chorych z wariantem polimorficznym Ser/Cys. U homozygot Cys/Cys nie stwierdzono żadnej transwersji G→T. Nie stwierdzono związku pomiędzy występowaniem określonego wariantu polimorficznego Ser326Cys genu *hOGG1* a częstością występowania transwersji G→T.

Dotychczas ukazało się jedno doniesienie podejmujące analizę polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* w odniesieniu do mutacji w genie *TP53* (56). Autorzy wykazali, że mutacje w genie *TP53* występowały

znamiennie częściej ($p=0,04$) wśród chorych na NDRP z genotypem Ser/Ser (59%), niż wśród chorych z genotypem Ser/Cys lub Cys/Cys (41%). Natomiast transwersję G→T stwierdzono w podobnym odsetku chorych na NDRP z genotypem Ser/Ser, jak i wśród nosicieli allelu Cys (21,1% vs. 13,7%; $p=0,37$).

Powyższe wyniki nie potwierdzają wcześniejszych doniesień dotyczących wpływu polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* na aktywność naprawczą białka hOGG1. Aczkolwiek w niniejszym badaniu jak i w doniesieniu Hu YC i wsp. grupy chorych z genotypem Cys/Cys były bardzo małe, zatem nie powinny stanowić podstawy do wniosków na temat wpływu polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* na częstość mutacji w genie *TP53* w tej grupie chorych. Z drugiej strony wyniki te mogą sugerować dominującą rolę policyklicznych węglowodorów aromatycznych (PAHs) w powstawaniu transwersji G→T w obrębie tytoniozależnych nowotworów (111). Te addukty są usuwane poprzez system naprawy DNA – NER (*nucleotide excision repair*) i mogą maskować wpływ polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* na aktywność naprawczą względem 8-oxo-G (12).

7.2. Polimorfizm SNP309 genu *MDM2*

7.2.1. Częstość występowania wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* u chorych na NDRP i w grupie kontrolnej

W niniejszej pracy podjęto analizę częstości występowania wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* w grupie chorych na NDRP i wśród osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną. Różnice w częstości występowania wariantów polimorficznych pomiędzy obiema grupami oraz rozkład alleli nie były znamienne (odpowiednio $p=0,068$ i $p=0,061$). W tym ostatnim przypadku stwierdzono większą częstość występowania allelu G w grupie chorych na NDRP w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio 36,36% i 29,6%).

Częstość występowania wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2*, zarówno wśród osób zdrowych, jak i u chorych na raka płuca w publikacjach różnych autorów jest zróżnicowana (tabela 40). Podobnie jak w przypadku polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1*, istotnym czynnikiem wpływającym na rozkład wariantów polimorficznych jest rasa. Stwierdza się znaczne różnice w częstości występowania poszczególnych wariantów polimorficznych między rasą kaukaską (białą), rasą żółtą i rasą afroamerykańską. Wśród osób zdrowych rasy kaukaskiej (białej) częstość występowania homozygot T/T waha się w granicach 36-44%, a homozygot G/G - 10-19%. Wśród osób zdrowych rasy żółtej wartości te wynoszą odpowiednio 19-31% i 20-28%, a wśród osób zdrowych rasy afroamerykańskiej – 80-85% i 2%. Liczba nosicieli allelu G jest najwyższa wśród osób rasy żółtej, a najniższa wśród osób rasy czarnej. Pine i wsp. wykazali istotne różnice w rozkładzie genotypów u rasy kaukaskiej (amerykańska rasa biała) oraz rasy czarnej ($p<0,001$) (104). Bond GL i wsp. ocenili w swojej pracy częstość występowania wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* wśród Żydów aszkenazyjskich (15). Rozkład wariantów w tej grupie był podobny do rozkładu stwierdzonego wśród osób rasy żółtej.

Częstość występowania wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* w populacji polskiej, oceniona w niniejszej pracy, różni się od częstości jaką obserwowano wśród osób rasy kaukaskiej. Zarówno odsetek homozygot G/G, jak i nosicieli allelu G jest wyraźnie niższy. Wyniki niniejszej pracy najbardziej pod tym względem zbliżone są do wyników jakie otrzymali Boersma BL i wsp. (13) wśród amerykańskiej rasy białej.

Różnice w rozkładzie wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* pomiędzy poszczególnymi rasami można stwierdzić również wśród chorych na raka płuca. U rasy żółtej częstość występowania allelu G jest wyraźnie największa, a wśród osób rasy czarnej - najmniejsza.

Częstość występowania wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* wśród chorych na NDRP w populacji polskiej, oceniona w niniejszej pracy, jest podobna do częstości wśród chorych na raka płuca rasy kaukaskiej opisywanej w trzech różnych doniesieniach (74, 75, 104).

Tabela 40. Częstość wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* w populacjach z różnych regionów geograficznych

| Populacja | Zdrowi | | | Chorzy na raka płuca | | | Pozycja piśmiennictwa |
|------------------------------|------------|------------|-----------|----------------------|------------|------------|------------------------|
| | T/T | T/G | G/G | T/T | T/G | G/G | |
| brytyjska | 41% | 43% | 16% | - | - | - | 20 |
| brytyjska | 47% | 37% | 16% | - | - | - | 29 |
| francuska | 46% | 40% | 14% | - | - | - | 36 |
| norweska | 39% | 50% | 11% | 38% | 46% | 16% | 75 |
| niemiecka | 42% | 44% | 14% | - | - | - | 130 |
| niemiecka | 38% | 51% | 10% | - | - | - | 15 |
| holenderska | 30% | 53% | 17% | - | - | - | 128 |
| duńska | 41% | 47% | 12% | - | - | - | 107 |
| fińska | 34% | 47% | 19% | - | - | - | 107 |
| fińska | 37% | 45% | 18% | - | - | - | 112 |
| włoska | 43% | 43% | 13% | - | - | - | 82 |
| amerykańska rasa biała | 38% | 44% | 18% | - | - | - | 112 |
| amerykańska rasa biała | 36% | 50% | 14% | 41% | 46% | 13% | 74 |
| amerykańska rasa biała | 43% | 44% | 13% | 40% | 45% | 15% | 104 |
| amerykańska rasa biała | 42% | 42% | 16% | - | - | - | 83 |
| amerykańska rasa biała | 44% | 46% | 10% | - | - | - | 13 |
| amerykańska rasa biała (98%) | 42% | 45% | 13% | - | - | - | 30 |
| Żydzi aszkenazyjscy | 27% | 49% | 24% | - | - | - | 15 |
| polska | 47% | 46% | 7% | 41% | 45% | 14% | niniejsza praca |
| chińska | 29% | 50% | 21% | 22% | 51% | 27% | 137 |
| chińska | 25% | 50% | 25% | 23% | 52% | 25% | 58 |
| chińska | 24% | 51% | 25% | - | - | - | 79 |
| chińska | 29% | 50% | 21% | - | - | - | 55 |
| koreańska | 21% | 51% | 28% | 18% | 48% | 34% | 99 |
| japońska | 23% | 55% | 22% | - | - | - | 92 |
| japońska | 19% | 54% | 27% | - | - | - | 32 |
| japońska | 31% | 49% | 20% | - | - | - | 54 |
| Afroamerykanie | 80% | 18% | 2% | - | - | - | 83 |
| Afroamerykanie | 80% | 18% | 2% | 83% | 15% | 2% | 104 |
| Afroamerykanie | 85% | 13% | 2% | - | - | - | 13 |
| amerykańska (różne rasy) | - | - | - | 42% | 40% | 18% | 52 |
| mieszana (różne rasy) | 41% | 48% | 11% | - | - | - | 125 |

7.2.2. Polimorfizm SNP309 genu *MDM2* w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP

W niniejszym badaniu analizowano związek pomiędzy ryzykiem zachorowania na NDRP a polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* według trzech modeli genetycznych. Rozpatrując model addytywny stwierdzono ponad dwukrotny wzrost ryzyka zachorowania na NDRP dla homozygot G/G, w porównaniu z homozygotami T/T (OR=2,27; 95%CI=1,04-4,93).

Bond GL i wsp. opisali polimorfizm SNP309 genu *MDM2* oraz wykazali, że jest on związany ze zwiększoną ekspresją białka Mdm2 oraz znamienne młodszym wiekiem pojawienia się guzów u chorych z zespołem Li-Fraumeni (16). Od tego czasu ukazało się wiele badań epidemiologicznych, w których autorzy analizowali zależność pomiędzy tym polimorfizmem a ryzykiem zachorowania na różne typy nowotworów (tabela 41).

Znamiennie zwiększone ryzyko związane z obecnością allelu G stwierdzono dla raka żołądka (92), przełyku (55), wątroby (32), endometrium (120, 125), nerki (54) i pęcherza moczowego (94). Takiej zależności nie stwierdzono natomiast dla raka piersi (13, 20, 30, 79, 83, 103, 130), jajnika (20), jelita grubego (6, 119) i skóry (132).

Tabela 41. Związek pomiędzy polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* a ryzykiem zachorowania na raka w innej lokalizacji niż płuca (przegląd piśmiennictwa)

| Umiejscowienie guza | Populacja | Chorzy | Kontrole | OR (95% CI) | Pozycja piśmiennictwa |
|---------------------|---------------------------------------|--------|----------|---|-----------------------|
| Żołądek | japońska | 410 | 438 | 0,9 (0,6-1,3) ^a 1,3 (0,9-2,1) ^b 1,03 (0,7-1,5) ^c 1,4 (1,02-2,0)^d | 92 |
| Przełyk | chińska | 758 | 1420 | 1,01 (0,8-1,2) ^a 1,5 (1,2-1,9)^b | 55 |
| Pierś | chińska | 366 | 605 | 1,1 (0,8-1,5) ^a 0,9 (0,6-1,4) ^b 1,03 (0,7-1,4) ^c | 79 |
| Pierś | amerykańska rasa biała | 1270 | 1133 | 1,1 (0,9-1,3) ^a 0,9 (0,7-1,1) ^b | 83 |
| Pierś | Afroamerykanie | 767 | 680 | 1,2 (0,9-1,6) ^a 0,8 (0,4-1,6) ^b | 83 |
| Pierś | turecka | 223 | 149 | 1,2 (0,7-2,1) ^a 1,1 (0,6-2,2) ^b | 103 |
| Pierś | niemiecka | 549 | 1065 | 1,1 (0,8-1,3) ^a 1,2 (0,9-1,7) ^b | 130 |
| Pierś | amerykańska rasa biała (98%) | 1519 | 2271 | 0,9 (0,8-1,1) ^a 0,98 (0,8-1,2) ^b | 30 |
| Pierś | amerykańska rasa biała | 125 | 136 | 0,6 (0,3-1,2) ^a 1,9 (0,8-4,6) ^b 0,8 (0,5-1,5) ^c | 13 |
| Pierś | Afroamerykanie | 165 | 178 | 1,7 (0,9-3,4) ^a 1,6 (0,8-3,1) ^c | 13 |
| Pierś | brytyjska | 351 | 258 | 1,04 (0,7-1,6) ^d | 20 |
| Jajnik | brytyjska | 302 | 258 | 0,9 (0,5-1,4) ^d | 20 |
| Wątroba | japońska | 187 | 248 | 1,6 (0,98-2,7) ^a 2,3 (1,3-4,0)^b 1,8 (1,1-2,9)^c 1,6 (1,1-2,5)^d | 32 |
| Endometrium | mieszana (80% amerykańska rasa biała) | 73 | 79 | 0,9 (0,4-1,9) ^a 2,6 (0,9-7,3) ^b 2,8 (1,1-7,2)^d | 125 |
| Endometrium | amerykańska rasa biała | 454 | 1132 | 1,9 (1,3-2,7)^b | 120 |
| Nerka | japońska | 200 | 200 | 0,8 (0,5-1,3) ^a 1,8 (1,1-2,9)^b 1,4 (0,9-2,2) ^c | 54 |
| Pęcherz moczowy | turecka | 75 | 103 | 2,7 (1,3-5,4)^d | 94 |

^a T/G vs T/T

^b G/G vs T/T

^c (G/G + T/G) vs T/T

^d G/G vs (T/G + T/T)

Dotychczas ukazało się sześć publikacji, w których autorzy oceniali związek pomiędzy ryzykiem zachorowania na raka płuca a polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* (tabela 42). Wyniki tych badań są bardzo zróżnicowane; w dwóch badaniach stwierdzono istotnie zwiększone ryzyko (75, 137), w trzech nie wykazano takiej zależności (58, 99, 104), a w jednym stwierdzono protekcyjny efekt tego polimorfizmu (74).

Tabela 42. Związek pomiędzy polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* a ryzykiem zachorowania na raka płuca (przegląd piśmiennictwa)

| Populacja | Chorzy | Kontrole | OR (95% CI) | Pozycja piśmiennictwa |
|---------------------------|--------|----------|--|-----------------------|
| koreańska | 582 | 582 | 1,04 (0,8-1,4) ^a 1,3 (0,9-1,8) ^b | 99 |
| norweska | 341 | 412 | 0,9 (0,7-1,3) ^a 1,57 (0,99-2,5) ^b 1,62 (1,06-2,5)^d | 75 |
| chińska | 1106 | 1420 | 1,3 (1,1-1,6)^a 1,8 (1,4-2,3)^b | 137 |
| chińska | 717 | 1082 | 1,2 (0,9-1,5) ^a 1,1 (0,8-1,5) ^b 1,2 (0,9-1,5) ^c | 58 |
| amerykańska rasa biała | 1026 | 1145 | 0,8 (0,7-0,98)^a 0,8 (0,6-1,1) ^b 0,8 (0,7-0,97)^c | 74 |
| amerykańska rasa biała | 371 | 421 | 1,1 (0,8-1,4) ^a 1,2 (0,8-1,9) ^b 1,1 (0,8-1,5) ^c | 104 |
| Afroamerykanie | 133 | 255 | 0,7 (0,4-1,3) ^a 0,5 (0,1-3,0) ^b 0,7 (0,4-1,2) ^c | 104 |
| polska | 132 | 253 | 1,2 (0,8-1,9) ^a 2,3 (1,04-4,9)^b 1,4 (0,9-2,1) ^c 2,1 (0,98-4,3) ^d | niniejsza praca |

^a T/G vs T/T

^b G/G vs T/T

^c (G/G + T/G) vs T/T

^d G/G vs (T/G + T/T)

Lind H i wsp. na podstawie badania obejmującego jednolitą etnicznie grupę 341 chorych na NDRP rasy kaukaskiej (populacja norweska) oraz 412 osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną stwierdzili, że genotyp G/G był związany z ponad 1,5-krotnym wzrostem względnego ryzyka zachorowania na NDRP (OR=1,62; 95%CI=1,06-2,50) (75). Jeszcze silniejszy efekt tego polimorfizmu autorzy wykazali w grupie kobiet, w której genotyp G/G był związany z czterokrotnym wzrostem względnego ryzyka zachorowania na NDRP (OR=4,06; 95%CI=1,29-12,8).

Wyniki powyższego badania zostały potwierdzone w dużej analizie typu *case-control* obejmującym jednolitą etnicznie grupę 1106 chorych na raka płuca rasy żółtej (populacja chińska) oraz 1420 osób zdrowych (137). Autorzy wykazali, że zarówno genotyp G/G, jak i T/G, mogą mieć wpływ na wzrost względnego ryzyka zachorowania na raka płuca (odpowiednio OR=1,83; 95%CI=1,45-2,32 i OR=1,33; 95%CI=1,09-1,63). Jeszcze silniejszy efekt tego polimorfizmu autorzy stwierdzili w grupie osób poniżej 60 roku życia (odpowiednio OR=2,19; 95%CI=1,62-2,97 i OR=1,63; 95%CI=1,25-2,11). W badaniu tym podjęto również analizę wpływu polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* na ryzyko zachorowania na raka płuca w zależności od historii palenia tytoniu. Wyniki były bardzo interesujące, gdyż wskazywały na addytywną zależność tego polimorfizmu i palenia tytoniu. W grupie nałogowych palaczy (powyżej 24 paczkolet) względne ryzyko zachorowania na raka płuca było ponad czterokrotnie większe dla genotypu T/G (OR=4,17; 95%CI=2,77-6,29) i ponad siedmiokrotnie większe dla genotypu G/G (OR=7,49; 95%CI=4,56-12,29) w porównaniu z osobami niepalącymi z genotypem T/T.

W trzech niezależnych badaniach przeprowadzonych wśród osób chorych na raka płuca rasy żółtej (58, 99), rasy kaukaskiej i rasy czarnej (104) autorzy nie stwierdzili związku pomiędzy polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* a ryzykiem zachorowania na raka płuca. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że u chorych na gruczolakoraka ryzyko to było blisko dwukrotnie większe w przypadku genotypu G/G (OR=1,91; 95%CI=1,16-3,14) (99).

Natomiast odmienne wyniki przedstawili Li G. i wsp., którzy analizowali jednolitą etnicznie grupę 1026 chorych na raka płuca i 1145 osób zdrowych amerykańskiej rasy białej (74). Autorzy ci wykazali zmniejszenie ryzyka zachorowania na raka płuca o blisko 20%, związane z genotypem G/T oraz G/T + G/G w porównaniu z genotypem T/T. Genotyp T/T był związany z 25% wzrostem ryzyka zachorowania na raka płuca, w porównaniu z pozostałymi genotypami, a wzrost ten był jeszcze bardziej wyraźny wśród mężczyzn, palaczy tytoniu, w grupie chorych na raka płaskonabłonkowego oraz w grupie chorych poniżej 60 roku życia. Powyższe wyniki były w sprzeczności zarówno w odniesieniu do wcześniejszych badań *in vitro* dotyczących roli polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* w komórce, jak i badań epidemiologicznych dotyczących zależności pomiędzy tym polimorfizmem a nowotworami o różnym umiejscowieniu.

W 2007 roku ukazały się dwie metaanalizy analizujące związek pomiędzy polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* a ryzykiem nowotworów. Wilkening S i wsp. analizowali dane z 11 badań dotyczących raka piersi (obejmujących 5737 chorych i 6703 kontroli), 5 badań dotyczących raka jelita grubego (1620 chorych i 886 kontroli) oraz 7 badań dotyczących raka płuca (4276 chorych i 5318 kontroli) (w tym jedno badanie dotyczyło wyłącznie wpływu polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* na czas przeżycia chorych na raka płuca). Autorzy wykazali niewielki, aczkolwiek znamieny wzrost ryzyka zachorowania na raka płuca u chorych z genotypem G/G w porównaniu z genotypem T/T (OR=1,27; 95%CI=1,12-1,44), podczas gdy nie znaleźli podobnej zależności w odniesieniu do tego polimorfizmu u chorych na raka piersi oraz raka jelita grubego (131). W drugiej metaanalizie badaniem objęto 14770 chorych na nowotwory o różnym umiejscowieniu i 14524 osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną z 25 badań typu *case-control*. Wykazano, że wariant G/G jest związany ze znamienym wzrostem ryzyka zachorowania na nowotwory (wszystkie typy łącznie) (OR=1.17;95%CI=1,04-1,33 dla modelu G/G vs T/T oraz OR=1,15; 95%CI=1,03-1,28 dla modelu recesywnego) (57).

Wyniki dotychczasowych doniesień są niejednoznaczne. Wydaje się jednak, że polimorfizm SNP309 genu *MDM2* może mieć wpływ na ryzyko zachorowania na różne typy nowotworów, zwłaszcza na raka płuca. Najpewniej istotny wpływ na zróżnicowanie wyników mogą mieć inne modyfikacje genów oraz czynniki środowiskowe. Różne podłoże genetyczne i różnorodne czynniki ryzyka mogą wyjaśniać, w pewnym stopniu, sprzeczne wyniki badań przeprowadzonych na różnych typach nowotworów i wśród różnych populacji. Ponadto większość pojedynczych badań miała za małą moc statystyczną dla wykrycia efektu działania genu o niskiej penetracji, co mogło również wpływać na wyniki. Należy podkreślić jednak, że wyniki dwóch metaanaliz, obejmujące duże populacje chorych i osób grupy kontrolnej wykazały, potencjalną rolę omawianego polimorfizmu jako markera wrażliwości na zachorowanie.

7.2.3. Kliniczna wartość polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* u chorych na NDRP

W niniejszej pracy nie stwierdzono zależności pomiędzy wariantami polimorficznymi SNP309 genu *MDM2* a cechami klinicznymi chorych na NDRP, takich jak płeć, wiek, palenie tytoniu, postać histologiczna raka, cecha T i cecha N w skali pTNM oraz stopień zróżnicowania guza.

Natomiast Lind i wsp. w analizie obejmującej 341 chorych na NDRP wykazali, że grupa chorych z genotypem G/G miała znamienne wyższy wiek w chwili rozpoznania choroby niż chorzy z genotypem T/T ($p=0,016$) (75).

7.2.4. Rokownicza wartość polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* u chorych na NDRP

Na podstawie niniejszej analizy nie stwierdzono wpływu polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* na przeżycie chorych na NDRP. Rola białka Mdm2 jako czynnika rokowniczego pozostaje niejasna i zależy od typu guza oraz innych czynników. Podczas, gdy nadekspresja białka Mdm2 koreluje dla pewnych guzów ze złym rokowaniem, to dla innych, paradoksalnie - z dobrym (95). Również analizy dotyczące tego zagadnienia u chorych na NDRP są sprzeczne. Dworakowska i wsp. wykazali u 116 chorych na NDRP, że amplifikacja genu *MDM2*, wykryta u 21% chorych, była związana ze znamienne krótszym przeżyciem (35). Natomiast Ko i wsp. stwierdzili, że ekspresja Mdm2-mRNA była związana z dłuższym przeżyciem u 81 chorych na NDRP (69). Z kolei Wang i wsp. wykazali trend do skrócenia czasu do wznowy u chorych na NDRP z niską ekspresją białka Mdm2 oraz stwierdzili lepsze rokowanie związane z fenotypem p53(-)/Mdm2(+) (127). Podobne wyniki uzyskali Higashiyama i wsp., którzy wykazali, że u 110 chorych na NDRP z dodatkowym brakiem ekspresji białka p53 obecność białka Mdm2 stanowiła czynnik korzystny rokowniczo (53). W innych doniesieniach natomiast nie wykazano związku pomiędzy ekspresją białka Mdm2 a czasem przeżycia u chorych na NDRP (1, 46, 69).

Do tej pory ukazało się jedno doniesienie dotyczące wpływu polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* na przeżycie chorych na NDRP. Heist R i wsp. na podstawie analizy obejmującej 383 chorych na NDRP we wczesnym stadium choroby (I i II stopień według klasyfikacji TNM) wykazali, że genotyp G/G może być związany z krótszym całkowitym przeżyciem (OS) w porównaniu z genotypem T/T (HR=1,57; 95%CI=1,03-2,40). Jeszcze silniejszy efekt tego polimorfizmu autorzy stwierdzili u chorych na raka płaskonabłonkowego, wśród których 5-letnie przeżycie w zależności od genotypu wynosiło: 59% dla T/T, 53% dla T/G i 7% dla G/G (52).

Wpływ polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* na rokowanie analizowano również wśród chorych na nowotwory o innym umiejscowieniu. Do tej pory wykazano, że genotyp G/G może stanowić niekorzystny czynnik rokowniczy u chorych na raka żołądka (92). Z drugiej strony Sanchez-Carbayo i wsp. wykazali, że genotyp T/T był związany z krótszym całkowitym przeżyciem u chorych na raka pęcherza moczowego (108). Natomiast u chorych na glejaka (36) i raka jajnika (44) nie wykazano związku między polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* a rokowaniem.

7.2.5. Zależność pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* i mutacji w genie *TP53*

Nadekspresja białka Mdm2 uważana jest za mechanizm komplementarny do inaktywacji drogi zależnej od p53 spowodowanej przez mutacje w genie *TP53*. A zatem, całkowita inaktywacja p53 przez polimorfizm SNP309 genu *MDM2* mogłaby ograniczyć rolę mutacji w genie *TP53* u chorych z genotypem G/G. Jednakże, w niniejszym badaniu nie stwierdzono związku pomiędzy polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* a częstością występowania mutacji w genie *TP53*. Podobnie, związku takiego nie stwierdzili również Lind i wsp. (75).

Warto wspomnieć, że do tej pory ukazały się tylko trzy doniesienia analizujące zależność pomiędzy polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* i mutacjami w genie *TP53* w odniesieniu do wieku wystąpienia nowotworu (75, 82) i przeżycia (13). Menin i wsp. w badaniu obejmującym 153 chorych na raka jelita grubego wykazali, że obecność allelu G była związana ze znamienne (p=0,03) niższym wiekiem (10 lat) w chwili ustalenia rozpoznania, u chorych posiadających „typ dziki” białka p53 (82). Wśród chorych, u których stwierdzono mutacje genu *TP53*, nie było takiego związku. Z kolei Lind i wsp., wykazali, że u chorych na NDRP z mutacjami w obrębie genu *TP53* obecność allelu G jest związana z wyższym wiekiem w chwili ustalenia rozpoznania (p=0,037). Natomiast u chorych bez mutacji nie

stwierdzono podobnej zależności (75). Boersma i wsp. analizowali zależność polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* i mutacji w genie *TP53* w odniesieniu do przeżycia chorych na raka piersi. Na podstawie analizy obejmującej 248 kobiet stwierdzili wzrost ryzyka zgonu (RR) związany z mutacjami w genie *TP53* tylko u tych chorych, które posiadały genotyp T/T (RR of death=2,33; 95%CI=1,08-5,03 dla T/T+typ dziki p53 vs T/T+mutacje p53) (13).

7.3. Współwystępowanie polimorfizmów Ser326Cys genu *hOGG1* i SNP309 genu *MDM2* w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP

W niniejszej pracy podjęto również łączną analizę obu polimorfizmów w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP. Ze względu na małą liczbę badanych w poszczególnych grupach analizę tę przeprowadzono przy zastosowaniu wskaźnika ryzyka, który został zbudowany na podstawie analizy jednoczynnikowej obu polimorfizmów. Stwierdzono, że ryzyko zachorowania na NDRP rośnie proporcjonalnie wraz ze wzrostem wskaźnika ryzyka.

W piśmiennictwie na ten temat nie ma doniesień analizujących oba wyżej wymienione polimorfizmy łącznie, w odniesieniu do ryzyka zachorowania na raka. Zarówno polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1*, jak i polimorfizm SNP309 genu *MDM2* mogą prowadzić do kancerogenezy, jednak na drodze dwóch różnych, niezależnych mechanizmów. Istotną jednak wydawała się analiza obu polimorfizmów jako niezależnych czynników predykcyjnych w NDRP. Jednak na podstawie modelu wieloczynnikowego wykazano, że genotypowanie *MDM2* nie dodaje wartości predykcyjnej do genotypowania *hOGG1* dla oceny ryzyka zachorowania na raka płuca.

8. PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy analizowano kliniczną i rokowniczą wartość polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* i polimorfizmu SNP309 genu *MDM2*. Wykazano, że allel Cys oraz genotyp G/G mogą być istotnymi czynnikami ryzyka zachorowania na NDRP. Analizę związku wymienionych polimorfizmów a ryzykiem zachorowania na NDRP przeprowadzono według trzech modeli genetycznych: recesywnego, dominującego i addytywnego, uwzględniając każdy rodzaj zależności pomiędzy allelami. W większości doniesień dotyczących omawianego zagadnienia autorzy, przedstawiają jeden ewentualnie dwa modele genetyczne („korzystne” dla wyniku badania). To powoduje również trudności w porównywaniu wyników poszczególnych analiz.

Przedstawiona praca ma przede wszystkim charakter poznawczy, jednak jej wyniki są zachęcające. Do ich potwierdzenia wskazane są dalsze wielośrodkowe badania na dużych grupach chorych. Dalsze badania nad polimorfizmami genów naprawczych oraz genów zaangażowanych w podstawowe czynności komórki takie jak wzrost, różnicowanie czy apoptoza mogłyby dać podstawy do wykorzystania powyższych wyników w praktyce klinicznej. Wskazanie profilu genetycznego, który zwiększa ryzyko zachorowania na raka płuca mogłoby pozwolić na wyodrębnienie populacji o szczególnie wysokim ryzyku zachorowania. W tej grupie zasadnym byłoby wykonywanie badań mających na celu wykrycie guza we wczesnym stadium (np. spiralna tomografia komputerowa), co pozwoliłoby na wczesne rozpoczęcie leczenia i najpewniej zwiększyłoby jego skuteczność.

9. WNIOSKI

1. Częstość występowania nosicieli allelu cysteinowego genu *hOGG1* wśród chorych na NDRP jest znamienne wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast różnice w częstości występowania wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* pomiędzy chorymi na NDRP a osobami zdrowymi nie są statystycznie znamienne
2. Występowanie allelu cysteinowego genu *hOGG1* oraz genotypu G/G genu *MDM2* jest związane ze znamienne wyższym ryzykiem zachorowania na NDRP
3. Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych badanych genów a cechami klinicznymi chorych na NDRP
4. Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych badanych genów a czasem przeżycia chorych na NDRP
5. Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych badanych genów a częstością występowania mutacji w genie *TP53*
6. Genotypowanie *MDM2* nie dodaje wartości predykcyjnej do genotypowania *hOGG1* dla oceny ryzyka zachorowania na NDRP

10. STRESZCZENIE

Celem niniejszego badania było określenie znaczenia polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* i odniesienie uzyskanych wyników do polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* w NDRP. Oceniono częstość występowania wariantów polimorficznych obu genów u chorych na NDRP i w grupie kontrolnej oraz ich znaczenie w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP. Ponadto analizowano wartość kliniczną i rokowniczą obu polimorfizmów oraz ich występowanie w odniesieniu do obecności mutacji w genie *TP53*. Oceniono również współwystępowanie polimorfizmów Ser326Cys genu *hOGG1* i SNP309 genu *MDM2* w odniesieniu do ryzyka zachorowania na NDRP.

Badaniem zostało objętych 142 chorych na NDRP (126 mężczyzn i 16 kobiet), w wieku od 42 do 78 lat (średnio 61 lat), poddanych doszczętej resekcji mięszu płucnego w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 1996-2000. Grupę kontrolną stanowiło 277 zdrowych osób z regionu województwa pomorskiego, dobranych pod względem wieku, płci i historii palenia tytoniu.

Analizę polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1* przeprowadzono z zastosowaniem techniki ASA-PCR, w wybranych 81 próbkach ze względu na niską wydajność reakcji przeprowadzono *nested* PCR. W celu weryfikacji uzyskanych wyników zsekwencjonowano 65 losowo wybranych próbek. Analizę polimorfizmu SNP309 genu *MDM2* przeprowadzono z zastosowaniem techniki RFLP-PCR.

Stwierdzono istotne różnice w rozkładzie genotypów Ser326Cys genu *hOGG1* pomiędzy grupą chorych na NDRP a grupą kontrolną (odpowiednio Ser/Ser – 58%, Ser/Cys – 35%, Cys/Cys – 8% i Ser/Ser – 79%, Ser/Cys – 19%, Cys/Cys – 3%; $p < 0,001$). Nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie genotypów SNP309 genu *MDM2* w obu badanych grupach (odpowiednio T/T – 41%, T/G – 46%, G/G – 14% i T/T – 47%, T/G – 46%, G/G – 7%; $p < 0,068$). Wykazano istotny wzrost ryzyka zachorowania na NDRP w zależności od liczby alleli Cys genu *hOGG1* (odpowiednio $OR = 2,7$;

95%CI=1,67-4,37; $p=0,0001$ dla wariantu Ser/Cys oraz $OR=3,78$; 95%CI=1,39-10,28, $p=0,009$ dla wariantu Cys/Cys). Stwierdzono również istotny wzrost ryzyka zachorowania na NDRP dla homozygot G/G genu *MDM2* ($OR=2,27$; 95%CI=1,04-4,93, $p=0,039$). Na podstawie analizy wieloczynnikowej wykazano, że genotypowanie *MDM2* nie dodaje wartości predykcyjnej do genotypowania *hOGG1* dla oceny ryzyka zachorowania na NDRP.

Wykazano znamienne różnice w rozkładzie wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* w zależności od cechy pN. Nie wykazano zależności pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych obu opisywanych genów a płcią, wiekiem, historią palenia tytoniu, postacią histologiczną raka, cechą pT oraz stopniem zróżnicowania guza. Nie stwierdzono również związku pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych obu genów a czasem całkowitego przeżycia oraz medianą czasu przeżycia chorych.

Ponadto nie wykazano także związku pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych obu genów a częstością występowania mutacji w genie *TP53*.

11. SPIS TABEL

- Tabela 1. Polimorfizmy genu *hOGG1* zlokalizowane w egzonach
- Tabela 2. Charakterystyka kliniczna chorych na NDRP (n = 142)
- Tabela 3. Startery do reakcji ASA-PCR
- Tabela 4. Skład mieszaniny do reakcji ASA-PCR określającej obecność allelu kodującego syrenę
- Tabela 5. Skład mieszaniny do reakcji ASA-PCR określającej obecność allelu kodującego cysteinę
- Tabela 6. Warunki reakcji ASA-PCR
- Tabela 7. Startery do reakcji nested PCR
- Tabela 8. Skład mieszaniny do reakcji ze starterami zewnętrznymi
- Tabela 9. Warunki reakcji ze starterami zewnętrznymi
- Tabela 10. Skład mieszaniny do reakcji ze starterami wewnętrznymi oraz starterem specyficznym dla allelu kodującego serynę
- Tabela 11. Skład mieszaniny do reakcji ze starterami wewnętrznymi oraz starterem specyficznym dla allelu kodującego cysteinę
- Tabela 12. Warunki reakcji ze starterami wewnętrznymi i specyficznymi
- Tabela 13. Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania
- Tabela 14. Warunki reakcji sekwencjonowania
- Tabela 15. Startery do reakcji PCR
- Tabela 16. Skład mieszaniny do reakcji PCR
- Tabela 17. Warunki reakcji PCR
- Tabela 18. Skład mieszaniny przygotowanej do reakcji trawienia
- Tabela 19. Rozkład wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* w grupie chorych na NDRP i w grupie kontrolnej.
- Tabela 20. Analiza współczynników ryzyka (OR) i 95% zakresów ufności (95% CI) dla polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1*. Model surowy (nieskorygowany)

- Tabela 21. Analiza współczynników ryzyka (OR) i 95% zakresów ufności (95% CI) dla polimorfizmu Ser326Cys genu *hOGG1*. Model skorygowany względem płci, wieku i historii palenia tytoniu
- Tabela 22. Analiza związku pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* a wybranymi cechami klinicznymi chorych na NDRP
- Tabela 23. Polimorfizm Ser326Cys genu *hOGG1* - analiza czasu przeżycia (model nieskorygowany i skorygowany o płeć, wiek i stopień zaawansowania)
- Tabela 24. Występowanie wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* a czas przeżycia
- Tabela 25. Współwystępowanie wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* i mutacji w genie *TP53*
- Tabela 26. Rozkład wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* w grupie chorych na NDRP i w grupie kontrolnej.
- Tabela 27. Analiza współczynników ryzyka (OR) i 95% zakresów ufności (95% CI) dla polimorfizmu SNP309 genu *MDM2*. Model surowy (nieskorygowany)
- Tabela 28. Analiza współczynników ryzyka (OR) i 95% zakresów ufności (95% CI) dla polimorfizmu SNP309 genu *MDM2*. Model skorygowany względem płci, wieku i historii palenia tytoniu
- Tabela 29. Analiza związku pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* a wybranymi cechami klinicznymi chorych na NDRP
- Tabela 30. Polimorfizm SNP309 genu *MDM2* - analiza czasu przeżycia (model nieskorygowany i skorygowany o płeć, wiek i stopień zaawansowania)
- Tabela 31. Występowanie wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* a czas przeżycia
- Tabela 32. Współwystępowanie wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* i mutacji w genie *TP53*

- Tabela 33. Rozkład cech ryzyka w badanej grupie
- Tabela 34. Analiza współczynników ryzyka (OR) i 95% zakresów ufności (95% CI) w zależności od wskaźnika ryzyka. Model surowy (nieskorygowany)
- Tabela 35. Analiza współczynników ryzyka (OR) i 95% zakresów ufności (95% CI) w zależności od wskaźnika ryzyka. Model skorygowany
- Tabela 36. Model wieloczynnikowy skorygowany
- Tabela 37. Częstość wariantów polimorficznych Ser326Cys genu *hOGG1* w populacjach z różnych regionów geograficznych
- Tabela 38. Związek pomiędzy polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* a ryzykiem zachorowania na raka w innej lokalizacji niż płuca (przegląd piśmiennictwa)
- Tabela 39. Związek pomiędzy polimorfizmem Ser326Cys genu *hOGG1* a ryzykiem zachorowania na raka płuca (przegląd piśmiennictwa)
- Tabela 40. Częstość wariantów polimorficznych SNP309 genu *MDM2* w populacjach z różnych regionów geograficznych
- Tabela 41. Związek pomiędzy polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* a ryzykiem zachorowania na raka w innej lokalizacji niż płuca (przegląd piśmiennictwa)
- Tabela 42. Związek pomiędzy polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* a ryzykiem zachorowania na raka płuca (przegląd piśmiennictwa)

12. SPIS RYCIN

Rycina 1. Struktura genu *hOGG1*

Rycina 2. Warianty składania pierwotnego transkryptu *hOGG1*

Rycina 3. *hOGG1* - naprawa uszkodzonego DNA przez wycinanie zasady
BER

Rycina 4 . Fragment sekwencji genu *hOGG1* - polimorfizm w kodonie 326

Rycina 5. Budowa genu *MDM2* i kodowanych przez niego białek p76Mdm2 i
p90Mdm2

Rycina 6. Pętla sprzężenia zwrotnego p53-Mdm2

Rycina 7. Związek pomiędzy polimorfizmem SNP309 genu *MDM2* a
powstaniem nowotworu

Rycina 8. Sekwencja egzonu 7 genu *hOGG1* zawierająca kodon serynowy

Rycina 9. Sekwencja egzonu 7 genu *hOGG1* zawierająca kodon cysteinowy

Rycina 10. Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA otrzymanych w
wyniku reakcji ASA-PCR

Rycina 11. Sekwencja egzonu 7 genu *hOGG1* zawierająca kodon serynowy

Rycina 12. Sekwencja egzonu 7 genu *hOGG1* zawierająca kodon cysteinowy

Rycina 13. Sekwencjonowanie fragmentu egzonu 7 genu *hOGG1*
zawierającego kodon 326 – wariant polimorficzny Ser/Ser

Rycina 14. Sekwencjonowanie fragmentu egzonu 7 genu *hOGG1*
zawierającego kodon 326 – wariant polimorficzny Ser/Cys

Rycina 15. Sekwencjonowanie fragmentu egzonu 7 genu *hOGG1*
zawierającego kodon 326 – wariant polimorficzny Cys/Cys

Rycina 16. Fragment sekwencji promotorowej genu *MDM2*

Rycina 17. Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA otrzymanych w
wyniku reakcji RFLP-PCR

Rycina 18. Prawdopodobieństwo przeżycia w badanej grupie chorych na
NDRP (n=142)

- Rycina 19. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na NDRP w zależności od wariantu polimorficznego Ser326Cys genu *hOGG1* – model recesywny
- Rycina 20. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na NDRP w zależności od wariantu polimorficznego Ser326Cys genu *hOGG1* – model dominujący
- Rycina 21. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na NDRP w zależności od wariantu polimorficznego Ser326Cys genu *hOGG1* model addytywny
- Rycina 22. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na NDRP w zależności od wariantu polimorficznego SNP309 genu *MDM2* – model recesywny
- Rycina 23. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na NDRP w zależności od wariantu polimorficznego SNP309 genu *MDM2* – model dominujący
- Rycina 24. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych na NDRP w zależności od wariantu polimorficznego SNP309 genu *MDM2* – model addytywny

13. PIŚMIENICTWO

1. Aikawa H, Sato M, Fujimura S, Takahashi H, Endo C, Sakurada A, Chen Y, Kondo T, Tanita T, Matsumura Y, Saito Y, Sagawa M. MDM2 expression is associated with progress of disease and WAF1 expression in resected lung cancer. *International Journal of Molecular Medicine*. 2000; 5: 631-633.
2. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92: 8493-8497.
3. Amos CI, Xu W, Spitz MR. Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? *Recent Results Cancer Research*. 1999; 151: 3-12.
4. Anderson KE, Carmella SG, Ye M, Bliss RL, Le C, Murphy L, Hecht SS. Metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen in nonsmoking women exposed to environmental tobacco smoke. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001; 93: 378-81.
5. Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis*. 2002; 23: 541-547.
6. Alazzouzi H, Suriano G, Guerra A, Plaja A, Espin E, Armengol M, Alhopuro P, Velho S, Shinomura Y, Gonzalez-Aguilera JJ, Yamamoto H, Aaltonen LA, Moreno V, Capella G, Peinado MA, Seruca R, Arango D, Schwartz S Jr. Tumour selection advantage of non-dominant negative P53 mutations in homozygotic MDM2-SNP309 colorectal cancer cells. *Journal of Medical Genetics*. 2007; 44: 75-80 (abstrakt).
7. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003; 123(Suppl 1): 21S-49S.
8. Arai K, Morishita K, Shinmura K, Kohno T, Kim SR, Nohmi T, Taniwaki M, Ohwada S, Yokota J. Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene* 1997; 14: 2857-2861.
9. Arva NC, Gopen TR, Talbott KE, Campbell LE, Chicas A, White DE, Bond GL, Levine AJ, Bargonetti J. A chromatin-associated and transcriptionally inactive p53-Mdm2 complex occurs in mdm2 SNP309

- homozygous cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280: 26776-26787.
10. Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tomioka Y, Itoh H, Kasai H. Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking. *Cancer Research*. 1996; 56: 2546-2549.
 11. Asami S, Manabe H, Miyake J, Tsurudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, Itoh H, Kasai H. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 1763-1766.
 12. Benhamou S, Sarasin A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutation Research*. 2000; 462: 149-158.
 13. Boersma BJ, Howe TM, Goodman JE, Yfantis HG, Lee DH, Chanock SJ, Ambros S. Association of breast cancer outcome with status of p53 and MDM2 SNP309. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006; 98: 911-919.
 14. Boiteux S, Radicella JP. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2000; 377: 1-8.
 15. Bond GL, Hirshfield KM, Kirchhoff T, Alexe G, Bond EE, Robins H, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Hait W, Toppmeyer D, Offit K, Levine AJ. MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer Research*. 2006; 66: 5104-5110.
 16. Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004; 119: 591-602.
 17. Bond GL, Hu W, Levine A. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect. *Cancer Research*. 2005; 65: 5481-5484.
 18. Bourdon J-C, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development*. 2005; 19: 2122-2137.

19. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *European Respiratory Journal*. 2001;18: 1059-68.
20. Campbell IG, Eccles DM, Choong DY. No association of the MDM2 SNP309 polymorphism with risk of breast or ovarian cancer. *Cancer Letters*. 2006; 240: 195-197.
21. Carbone D. Smoking and cancer. *The American Journal of Medicine*. 1992; 93: 13S-17S.
22. Checkoway H, Hughes JM, Weill H, Seixas NS, Demers PA. Crystalline silica exposure, radiological silicosis, and lung cancer mortality in diatomaceous earth industry workers. *Thorax*. 1999; 54: 56-9.
23. Chen L, Elahi A, Pow-Sang J, Lazarus P, Park J. Association between polymorphism of human oxoguanine glycosylase 1 and risk of prostate cancer. *Journal of Urology*. 2003; 170: 2471-2474.
24. Chene P, Mittl P, Grutter M. In vitro structure-function analysis of the beta-strand 326-333 of human p53. *Journal of Molecular Biology*. 1997; 273: 873-881.
25. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267: 166-172.
26. Cho EY, Hildesheim A, Chen CJ, Hsu MM, Chen ICH, Mittl BF, Levine PH, Liu MY, Chen JY, Brinton LA, Cheng YJ, Yang CS. Nasopharyngeal carcinoma and genetic polymorphisms of DNA repair enzymes XRCC1 and hOGG1. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2003; 12: 1100-1104.
27. Choi JY, Hamajima N, Tajima K, Yoo KY, Yoon KS, Park SK, Kim SU, Lee KM, Noh DY, Ahn SH, Choe KJ, Han W, Hirvonen A, Kang D. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and breast cancer risk among Asian women. *Breast Cancer Research & Treatment*. 2003; 79: 59-62.
28. Churg A, Stevens B. Enhanced retention of asbestos fibers in the airways of human smokers. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*. 1995; 151: 1409-13.
29. Copson ER, White HE, Blaydes JP, Robinson DO, Johnson PW, Eccles DM. Influence of the MDM2 single nucleotide polymorphism SNP309 on

- tumour development in BRCA1 mutation carriers. *BMC Cancer*. 2006, 6: 80-85.
30. Cox DG, Deer D, Guo Q, Tworoger SS, Hankinson SE, Hunter DJ, De Vivo I. The p53 Arg72Pro and MDM2 -309 polymorphisms and risk of breast cancer in the nurses' health studies. *Cancer Causes & Control*. 2007; 18: 621-625.
 31. Cunningham RP. DNA glycosylases. *Mutation Research*. 1997; 383: 189-196.
 32. Dharel N, Kato N, Muroyama R, Moriyama M, Shao RX, Kawabe T, Omata M. MDM2 promoter SNP309 is associated with the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12: 4867-4871.
 33. Didkowska J, Wojciechowska U, Tarkowski W, Zatoński W. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2005 roku*. Warszawa 2007.
 34. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genetics*. 2003; 33: 357-365.
 35. Dworakowska D, Jassem E, Jassem J, Peters B, Dziadziuszko R, Zylicz M, Jakobkiewicz-Banecka J, Kobińska-Gulida G, Szymanowska A, Skokowski J, Roessner A, Schneider-Stock R. MDM2 gene amplification: a new independent factor of adverse prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*. 2004; 43: 285-295.
 36. El Hallani S, Marie Y, Idbaih A, Rodero M, Boisselier B, Laigle-Donadey F, Ducray F, Delattre JY, Sanson M. No association of MDM2 SNP309 with risk of glioblastoma and prognosis. *Journal of Neuro-Oncology*. 2007; 85: 241-244.
 37. Elahi A, Zheng Z, Park J, Eyring K, McCaffrey T, Lazarus P. The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2002; 23: 1229-1234.
 38. Emmons KM. Smoking cessation and tobacco control: an overview. *Chest*. 1999; 116(Suppl 6): 490S-492S.
 39. Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. Mdm2 overexpression and p14(ARF) inactivation are two mutually exclusive events in primary human lung tumors. *Oncogene*. 2002; 21: 2750-27561.

40. Fromme JC, Banerjee A, Verdine GL. DNA glycosylase recognition and catalysis. *Current Opinion in Structural Biology*. 2004; 14: 43-49.
41. Fromme JC, Bruner SD, Yang W, Karplus M, Verdine GL. Product-assisted catalysis in base-excision DNA repair. *Nature Structural Biology*. 2003; 10: 204-211.
42. Fukuyama Y, Mitsudomi T, Sugio K, Ishida T, Akazawa K, Sugimachi K. K-ras and p53 mutations are an independent unfavourable prognostic indicator in patients with non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*. 1997; 75: 1125-1130.
43. Gackowski D, Kowalewski J, Siomek A, Olinski R. Oxidative DNA damage and antioxidant vitamin level: comparison among lung cancer patients, healthy smokers and nonsmokers. *International Journal of Cancer*. 2005; 114: 153-156.
44. Galic V, Willner J, Wollan M, Garg R, Garcia R, Goff BA, Gray HJ, Swisher EM. Common polymorphisms in TP53 and MDM2 and the relationship to TP53 mutations and clinical outcomes in women with ovarian and peritoneal carcinomas. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2007; 46: 239-247 (abstrakt).
45. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2002; 11: 1513-1530.
46. Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Kyroudi A, Veslemes M, Rassidakis A, Halazonetis TD, Field JK, Kittas C. Alterations of the p16-pRb pathway and the chromosome locus 9p21-22 in non-small-cell lung carcinomas: relationship with p53 and MDM2 protein expression. *American Journal of Pathology*. 1998; 153: 1749-1765.
47. Gresner P, Gromadzinska J, Wasowicz W. Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer. *Lung Cancer*. 2007; 57: 1-25.
48. Haldane JBS. An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics*. 1954; 52: 631-635.
49. Hanaoka T, Sugimura H, Nagura K, Ihara M, Li XJ, Hamada GS, Nishimoto I, Kowalski LP, Yokota J, Tsugane S. hOGG1 exon7

- polymorphism and gastric cancer in case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Letters*. 2001; 170: 53-61.
50. Hao B, Wang H, Zhou K, Li Y, Chen X, Zhou G, Zhu Y, Miao X, Tan W, Wei Q, Lin D, He F. Identification of genetic variants in base excision repair pathway and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Research*. 2004; 64: 4378-4384.
 51. Harpole DH Jr, Herndon JE 2nd, Young WG Jr, Wolfe WG, Sabiston DC Jr. Stage I nonsmall cell lung cancer. A multivariate analysis of treatment methods and patterns of recurrence. *Cancer*. 1995; 76: 787-96.
 52. Heist RS, Zhou W, Chirieac LR, Cogan-Drew T, Liu G, Su L, Neuberg D, Lynch TJ, Wain JC, Christiani DC. MDM2 polymorphism, survival, and histology in early-stage non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007; 25: 2243-2247.
 53. Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Kasugai T, Ishiguro S, Takami K, Nakayama T, Nishisho I. MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *British Journal of Cancer*. 1997; 75: 1302-1308 (abstrakt).
 54. Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N, Kawamoto K, Suehiro Y, Tanaka Y, Dahiya R. MDM2 SNP309 polymorphism as risk factor for susceptibility and poor prognosis in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2007; 13: 4123-4129.
 55. Hong Y, Miao X, Zhang X, Ding F, Luo A, Guo Y, Tan W, Liu Z, Lin D. The role of P53 and MDM2 polymorphisms in the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Research*. 2005; 65: 9582-9587.
 56. Hu YC, Ahrendt SA. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and G:C-to-T:A mutations: no evidence for a role in tobacco-related non small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*. 2005; 114: 387-393.
 57. Hu Z, Jin G, Wang L, Chen F, Wang X, Shen H. MDM2 promoter polymorphism SNP309 contributes to tumor susceptibility: evidence from 21 case-control studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2007; 16: 2717-2723 (abstrakt).

58. Hu Z, Ma H, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, Xu L, Wang X, Wei Q, Shen H. Genetic variants in the MDM2 promoter and lung cancer risk in a Chinese population. *International Journal of Cancer*. 2006; 118: 1275-1278.
59. Hung RJ, Brennan P, Canzian F, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Foretova L, Janout V, Bencko V, Chabrier A, Borel S, Hall J, Boffetta P. Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005; 97: 567-576.
60. Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*. 2005; 162: 925-942.
61. Inoue M, Osaki T, Noguchi M, Hirohashi S, Yasumoto K, Kasai H. Lung cancer patients have increased 8-hydroxydeoxyguanosine levels in peripheral lung tissue DNA. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1998; 89: 691-695.
62. Ishida T, Hippo Y, Nakahori Y, Matsushita I, Kodama T, Nishimura S, Aburatani H. Structure and chromosome location of human OGG1. *Cytogenetics and cell genetics*. 1999; 85; 232-236.
63. Ito H, Hamajima N, Takezaki T, Matsuo K, Tajima K, Hatooka S, Mitsudomi T, Suyama M, Sato S, Ueda R. A limited association of OGG1 Ser326Cys polymorphism for adenocarcinoma of the lung. *Journal of Epidemiology*. 2002; 12: 258-265.
64. Iwakuma T, Lozano G. MDM2, an introduction. *Molecular Cancer Research*. 2003; 1: 993-1000.
65. Jassem J, Jassem E, Jakobkiewicz-Banecka J, Rzyman W, Badzio A, Dziadziuszko R, Kobierska-Gulida G, Szymanowska A, Skrzypski M, Zylicz M. P53 and K-ras mutations are frequent events in microscopically negative surgical margins from patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2004; 100: 1951-1960.
66. Jensen A, Calvayrac G, Karahalil B, Bohr VA, Stevnsner T. Mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 incises 8-oxoadenine opposite cytosine in nuclei and mitochondria, while a different glycosylase incises 8-oxoadenine opposite guanine in nuclei. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 19541-19548.

67. Kim JI, Park YJ, Kim KH, Kim JI, Song BJ, Lee MS, Kim CN, Chang SH. hOGG1 Ser326Cys polymorphism modifies the significance of the environmental risk factor for colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2003; 9: 956-960.
68. Kiyohara C, Otsu A, Shirakawa T, Fukuda S, Hopkin JM. Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: a review. *Lung Cancer*. 2002; 37: 241-56.
69. Ko JL, Cheng YW, Chang SL, Su JM, Chen CY, Lee H. MDM2 mRNA expression is a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *International Journal of Cancer*. 2000; 89: 265-270 (abstrakt).
70. Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim SR, Sugimura H, Nohmi T, Kasai H, Yokota J. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene*. 1998; 16: 3219-3225.
71. Lan Q, Mumford JL, Shen M, Demarini DM, Bonner MR, He X, Yeager M, Welch R, Chanock S, Tian L, Chapman RS, Zheng T, Keohavong P, Caporaso N, Rothman N. Oxidative damage-related genes AKR1C3 and OGG1 modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Carcinogenesis*. 2004; 25: 2177-2181.
72. Lau CL, D'Amico TA, Harpole DH Jr. Clinical and molecular prognostic factors and models for non-small cell lung cancer. W: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT, Minna JD. Lung cancer. Principles and practice. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000; 602-611.
73. Le Marchand L, Donlon T, Lum-Jones A, Seifried A, Wilkens LR. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2002; 11: 409-412.
74. Li G, Zhai X, Zhang Z, Chamberlain RM, Spitz MR, Wei Q. MDM2 gene promoter polymorphisms and risk of lung cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis*. 2006; 27: 2028-2033.
75. Lind H, Zienolddiny S, Ekstrom PO, Skaug V, Haugen A. Association of a functional polymorphism in the promoter of the MDM2 gene with risk of nonsmall cell lung cancer. *International Journal of Cancer*. 2006; 119: 718-721.

76. Lodovici M, Casalini C, Cariaggi R, Michelucci L, Dolara P. Levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of DNA damage in human leukocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. 2000; 28: 13-17.
77. Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjønneland A, Overvad K, Poulsen HE. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis*. 1992; 13: 2241-2247.
78. Lu R, Nash HM, Verdine GL. A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Current Biology*. 1997; 7: 397-407.
79. Ma H, Hu Z, Zhai X, Wang S, Wang X, Qin J, Jin G, Liu J, Wang X, Wei Q, Shen H. Polymorphisms in the MDM2 promoter and risk of breast cancer: a case-control analysis in a Chinese population. *Cancer Letters*. 2006; 240: 261-267.
80. McCullough AK, Dodson ML, Lloyd RS. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annual review of biochemistry*. 1999; 68: 255-285.
81. Meert AP, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Mascaux C, Verdebout JM, Delmotte P, Lafitte JJ, Sculier JP. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *British Journal of Cancer*. 2003; 89: 959-965.
82. Menin C, Scaini MC, De Salvo GL, Biscuola M, Quaggio M, Esposito G, Belluco C, Montagna M, Agata S, D'Andrea E, Nitti D, Amadori A, Bertorelle R. Association between MDM2-SNP309 and age at colorectal cancer diagnosis according to p53 mutation status. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006; 98: 285-288.
83. Millikan RC, Heard K, Winkel S, Hill EJ, Heard K, Massa B, Mayes L, Williams P, Holston R, Conway K, Edmiston S, de Cotret AR. No association between the MDM2 -309 T/G promoter polymorphism and breast cancer in African-Americans or Whites. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2006; 15: 175-177.
84. Mitchell ELD, White GRM, Santibanez-Koref MF, Varley JM, Heighway J. Mapping of gene loci in the q13-q15 region of chromosome 12. *Chromosome Research*. 1995; 3: 261-262.

85. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Research*. 1998; 26: 3453-3459.
86. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George DL, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. 1992; 69: 1237-1245.
87. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*. 1997; 111: 1710-1717.
88. Nafstad P, Håheim LL, Wisløff T, Gram F, Oftedal B, Holme I, Hjermann I, Leren P. Urban air pollution and mortality in a cohort of Norwegian men. *Environmental health perspectives*. 2004; 112: 610-5.
89. Nikliński J, Niklińska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001; 34(Suppl 2): S53-S58.
90. Nishioka K, Ohtsubo T, Oda H, Fujiwara T, Kang D, Sugimachi K, Nakabeppu Y. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Molecular biology of the cell*. 1999; 10: 1637-1652.
91. de Oca Luna RM, Tabor AD, Eberspaecher H, Hulboy DL, Worth LL, Colman MS, Finlay CA, Lozano G. The organization and expression of the mdm2 gene. *Genomics*. 1996; 33: 352-357.
92. Ohmiya N, Taguchi A, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Goto H. MDM2 promoter polymorphism is associated with both an increased susceptibility to gastric carcinoma and poor prognosis. *Journal of Clinical Oncology*. 2006; 24: 4434-4440.
93. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*. 1992; 358: 80-83.
94. Onat OE, Tez M, Ozcelik T, Toruner GA. MDM2 T309G polymorphism is associated with bladder cancer. *Anticancer Research*. 2006; 26: 3473-3475 (abstrakt).
95. Onel K, Cordon-Cardo C. MDM2 and prognosis. *Molecular Cancer Research: MCR*. 2004; 2: 1-8.

96. Ooi WL, Elston RC, Chen VW, Bailey-Wilson JE, Rothschild H. Increased familial risk for lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1986; 76: 217-22.
97. Padilla J, Calvo V, Peñalver JC, Sales G, Morcillo A. Surgical results and prognostic factors in early non-small cell lung cancer. *The Annals of thoracic surgery*. 1997; 63: 324-326.
98. Park J, Chen L, Tockman MS, Elahi A, Lazarus P. The human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (hOGG1) DNA repair enzyme and its association with lung cancer risk. *Pharmacogenetics*. 2004; 14: 103-109.
99. Park SH, Choi JE, Kim EJ, Jang JS, Han HS, Lee WK, Kang YM, Park JY. MDM2 309T>G polymorphism and risk of lung cancer in a Korean population. *Lung Cancer*. 2006; 54: 19-24.
100. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *European Journal of Cancer*. 2001; 37(Suppl 8): S4-S66.
101. Pavletich NP., Chambers KA, Pabo CO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes & Development*. 1993; 7: 2556-2564.
102. Paz-Elizur T, Krupsky M, Blumenstein S, Elinger D, Schechtman E, Livneh Z. DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003; 95:1312-1319.
103. Petenkaya A, Bozkurt B, Akilli-Ozturk O, Kaya HS, Gur-Dedeoglu B, Yulug IG. Lack of association between the MDM2-SNP309 polymorphism and breast cancer risk. *Anticancer Research*. 2006; 26: 4975-4977 (abstrakt).
104. Pine SR, Mechanic LE, Bowman ED, Welsh JA, Chanock SC, Shields PG, Harris CC. MDM2 SNP309 and SNP354 are not associated with lung cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2006; 15: 1559-1561.
105. Radicella JP, Dherin C, Desmaze C, Fox MS, Boiteux S. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94: 8010-8015.
106. Rosell R, Monzo M, Molina F, Martinez E, Pifarre A, Moreno I, Mate JL, de Anta JM, Sanchez M, Font A. K-ras genotypes and prognosis in non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*. 1995; 6(Suppl 3): S15-S20.

107. Ruijs MW, Schmidt MK, Nevanlinna H, Tommiska J, Aittomaki K, Prunel R, Verhoef S, Van't Veer LJ. The single-nucleotide polymorphism 309 in the MDM2 gene contributes to the Li-Fraumeni syndrome and related phenotypes. *European Journal of Human Genetics*. 2007; 15: 110-114.
108. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Kirchoff T, Erill N, Offit K, Bochner BH, Cordon-Cardo C. A polymorphism in HDM2 (SNP309) associates with early onset in superficial tumors, TP53 mutations, and poor outcome in invasive bladder cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007; 13: 3215-3220.
109. Sang BC, Chen JY, Minna J, Barbosa MS. Distinct regions of p53 have a differential role in transcriptional activation and repression functions. *Oncogene*. 1994; 9: 853-859.
110. Shaw GL, Falk RT, Pickle LW, Mason TJ, Buffler PA. Lung cancer risk associated with cancer in relatives. *Journal of Clinical Epidemiology*. 1991; 44: 429-437.
111. Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M, Pfeifer GP. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92: 803-811.
112. Sotamaa K, Liyanarachchi S, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Peltomaki P, de la Chapelle A. p53 codon 72 and MDM2 SNP309 polymorphisms and age of colorectal cancer onset in Lynch syndrome. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11: 6840-6844.
113. Spivack SD, Fasco MJ, Walker VE, Kaminsky LS. The molecular epidemiology of lung cancer. *Critical Reviews in Toxicology*. 1997; 27: 319-365.
114. Sugimura H, Kohno T, Wakai K, Nagura K, Genka K, Igarashi H, Morris BJ, Baba S, Ohno Y, Gao C, Li Z, Wang J, Takezaki T, Tajima K, Varga T, Sawaguchi T, Lum JK, Martinson JJ, Tsugane S, Iwamasa T, Shinmura K, Yokota J. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1999; 8: 669-674.
115. Sunaga N, Kohno T, Yanagitani N, Sugimura H, Kunitoh H, Tamura T, Takei Y, Tsuchiya S, Saito R, Yokota J. Contribution of the NQO1 and GSTT1 polymorphisms to lung adenocarcinoma susceptibility. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2002; 11: 730-738.

116. Szymanowska A, Jassem E, Dziadziuszko R, Borg A, Limon J, Kobierska-Gulida G, Rzyman W, Jassem J. Increased risk of non-small cell lung cancer and frequency of somatic TP53 gene mutations in Pro72 carriers of TP53 Arg72Pro polymorphism. *Lung Cancer*. 2006; 52: 9-14.
117. Takao M, Aburatani H, Kobayashi K, Yasui A. Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*. 1998; 26: 2917-2922.
118. Takezaki T, Gao CM, Wu JZ, Li ZY, Wang JD, Ding JH, Liu YT, Hu X, Xu TL, Tajima K, Sugimura H. hOGG1 Ser(326)Cys polymorphism and modification by environmental factors of stomach cancer risk in Chinese. *International Journal of Cancer*. 2002; 99: 624-627.
119. Talseth BA, Meldrum C, Suchy J, Kurzawski G, Lubinski J, Scott RJ. MDM2 SNP309 T>G alone or in combination with the TP53 R72P polymorphism does not appear to influence disease expression and age of diagnosis of colorectal cancer in HNPCC patients. *International Journal of Cancer*. 2007; 120: 563-565 (abstrakt).
120. Terry K, McGrath M, Lee IM, Buring J, De Vivo I. MDM2 SNP309 is associated with endometrial cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 2008; 17: 983-986 (abstrakt).
121. Travis JL, Linder J, Mackay B. Classification, histology, cytology and electron microscopy. W: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT, Minna JD. Lung cancer. Principles and practice. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000; 453-495.
122. Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clinics in chest medicine*. 2002; 23: 65-81.
123. Vogel U, Nexø BA, Olsen A, Thomsen B, Jacobsen NR, Wallin H, Overvad K, Tjønneland A. No association between OGG1 Ser326Cys polymorphism and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2003; 12: 170-171.
124. Vogel U, Olsen A, Wallin H, Overvad K, Tjønneland A, Nexø BA. No association between OGG1 Ser326Cys and risk of basal cell carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2004; 13: 1680-1681.

125. Walsh CS, Miller CW, Karlan BY, Koeffler HP. Association between a functional single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene and sporadic endometrial cancer risk. *Gynecologic Oncology*. 2007; 104: 660-664.
126. Wang YC, Lee HS, Chen SK, Chang YY, Chen CY. Prognostic significance of p53 codon 72 polymorphism in lung carcinomas. *European Journal of Cancer*. 1999; 35: 226-230.
127. Wang YC, Lin RK, Tan YH, Chen JT, Chen CY, Wang YC. Wild-type p53 overexpression and its correlation with MDM2 and p14ARF alterations: an alternative pathway to non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23: 154-164.
128. Wasielewski M, Nagel JH, Brekelmans C, Klijn JG, van den Ouweland A, Meijers-Heijboer H, Schutte M. MDM2 SNP309 accelerates familial breast carcinogenesis independently of estrogen signaling. *Breast Cancer Research & Treatment*. 2007; 104: 153-157.
129. Wikman H, Risch A, Klimek F, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, Kayser K, Schulz V, Drings P, Bartsch H. hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population. *International Journal of Cancer*. 2000; 88: 932-937.
130. Wilkening S, Bermejo JL, Burwinkel B, Klaes R, Bartram CR, Meindl A, Bugert P, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, Untch M, Hemminki K, Forsti A. The single nucleotide polymorphism IVS1+309 in mouse double minute 2 does not affect risk of familial breast cancer. *Cancer Research*. 2006; 66: 646-648.
131. Wilkening S, Bermejo JL, Hemminki K. MDM2 SNP309 and cancer risk: a combined analysis. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 2262-2267.
132. Wilkening S, Hemminki K, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Forsti A, Kumar R. No association between MDM2 SNP309 promoter polymorphism and basal cell carcinoma of the skin. *British Journal of Dermatology*. 2007; 157: 375-377 (abstrakt).
133. Wood ML, Esteve A, Morningstar ML, Kuziemko GM, Essigmann JM. Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 1992; 20: 6023-6032.

134. Xing DY, Tan W, Song N, Lin DX. Ser326Cys polymorphism in hOGG1 gene and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *International Journal of Cancer*. 2001; 95: 140-143.
135. Xu J, Zheng SL, Turner A, Isaacs SD, Wiley KE, Hawkins GA, Chang BL, Bleecker ER, Walsh PC, Meyers DA, Isaacs WB. Associations between hOGG1 sequence variants and prostate cancer susceptibility. *Cancer Research*. 2002; 62: 2253-2257.
136. Yamane A, Kohno T, Ito K, Sunaga N, Aoki K, Yoshimura K, Murakami H, Nojima Y, Yokota J. Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo. *Carcinogenesis*. 2004; 25: 1689-1694.
137. Zhang X, Miao X, Guo Y, Tan W, Zhou Y, Sun T, Wang Y, Lin D. Genetic polymorphisms in cell cycle regulatory genes MDM2 and TP53 are associated with susceptibility to lung cancer. *Human Mutation*. 2006; 27: 110-117.
138. Zhang Z, Shi Q, Wang LE, Sturgis EM, Spitz MR, El-Naggar AK, Hong WK, Wei Q. No Association between hOGG1 Ser326Cys polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2004; 13: 1081-1083.
139. Zheng SL, Sun J, Wiklund F, Smith S, Stattin P, Li G, Adami HO, Hsu FC, Zhu Y, Balter K, Kader AK, Turner AR, Liu W, Bleecker ER, Meyers DA, Duggan D, Carpten JD, Chang BL, Isaacs WB, Xu J, Gronberg H. Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008; 358: 910-919.
140. Zhou X, Wang XW, Xu L, Hagiwara K, Nagashima M, Wolkowicz R, Zurer I, Rotter V, Harris CC. COOH-terminal domain of p53 modulates p53-mediated transcriptional transactivation, cell growth, and apoptosis. *Cancer Research*. 1999; 59: 843-848.

ZAŁĄCZNIK 1

Aparatura

| Aparatura | Nazwa producenta |
|---|--|
| Sekwenator automatyczny Genetic Analyser ABI PRISM 310 | <i>Applied Biosystems</i> |
| Termocykler GeneAmp PCR System 2720 | |
| Termocykler GeneAmp PCR System 2700 | |
| Zestaw do elektroforezy agarozowej Sub Cell GT | <i>Bio-Rad</i> |
| Zestaw do elektroforezy poliakrylamidowej Mini Protein 3 | |
| Zasilacz do elektroforezy, PowerPac 3000 | |
| Transiluminator GelDoc 2000 | |
| System do archiwizacji żeli GelDoc 2000 | |
| Wirówka MiniSpin Plus | <i>Eppendorf</i> |
| Wirówka 5804R | |
| Wirówka Mini Centrifuge | |
| Pipety automatyczne | |
| Vortex | <i>IKA</i> |
| Spektrofotometr Gene Quant II | <i>Pharmacia LKB</i> |
| Waga elektroniczna | <i>CAS</i> |
| Cieplarka Heraeus Function Line B6 | <i>Thermo Electron Corporation</i> |
| Chłodziarko-zamrażarka | <i>Vestrost</i> |
| Aparat do oczyszczania i dejonizacji wody MilliQUF Plus | <i>Millipor</i> |

Odczynniki

| Odczynnik | Nazwa Producenta |
|---|------------------------------|
| EDTA | <i>Sigma</i> |
| KHCO ₃ | |
| NaCl | |
| NH ₄ Cl | |
| TEMED | |
| APS | |
| Bromek etydyny | |
| Tris | |
| Kwas borny | |
| Błękit bromofenolowy | |
| Cyjanol ksylenu | |
| Sacharoza | |
| Bufor PCR | |
| MgCl ₂ 25mM | |
| dNTPs | |
| Polimeraza Taq Gold | |
| Bufor z (NH ₄) ₂ SO ₄ | <i>MBI Fermentas</i> |
| MgCl ₂ 25mM | |
| Polimeraza Taq | |
| Marker wielkości M25-700 | |
| Startery | <i>IBB PAN</i> |
| Agaroza | <i>Prona</i> |
| Akrylamid | <i>Bio-Rad</i> |
| Marker wielkości M100-500 | <i>DNA Gdańsk II</i> |
| Kwas octowy | <i>POCH</i> |
| Zestaw Clean-Up | <i>A&A Biotechnology</i> |
| Zestaw Ex-Terminator | |

| | |
|--|----------------------------|
| BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v 3.1 | <i>Applied Biosystems</i> |
| Polimer POP-4 | |
| Enzym restrykcyjny MspAII | <i>New England BioLabs</i> |
| NEBuffer 4 | |
| BSA | |

Roztwory

| Roztwór | Skład |
|----------------------------------|--|
| 5x bufor TBE (1000 ml) | 54g Tris 27,5g kwas borny 20 ml 0,5M, pH=0,8 EDTA uzupełnić ddH ₂ O |
| 50x bufor TAE (1000 ml) | 242g Tris 57.1nl lodowaty kwas octowy 100 ml 0,5M, pH=0,8 EDTA uzupełnić ddH ₂ O |
| 6x bufor obciążający | 0,25 % błękit bromofenolowy 0,25% cyjanol ksylenu 40% sacharoza |
| Żel agarozowy 2% (100ml) | 2g agaroz 5 µl Bromek etydyny 100 ml 0,5 TBE |
| Roztwór akrylamidowy 10% (100ml) | 33,3 ml 30 akrylamid 2 ml 50 x TAE 64,5 ddH ₂ O |
| Żel poliakrylamidowy | 5 ml 10% roztwór akrylamidowy 40 µl APS 10 µl TEMED |

| | |
|---|---|
| Roztwór do barwienia żeli poliakrylamidowych | 20 µl bromek etydyny 100 ml 1x TAE |
| NaCl/EDTA (1000 ml) | 4,37 g NaCl 2 ml 0,5M EDTA uzupełnić ddH ₂ O |
| 10% SDS (100 ml) | 10 g SDS uzupełnić ddH ₂ O |