

PA 21175



UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Analiza genskih varijanti u hroničnoj
opstruktivnoj bolesti pluća kod čoveka

DOKTORSKA TEZA



Marija M. Stanković

Beograd, 2010

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
"СВЕТОСАР МАРКОВИЋ"-БЕОГРАД
И. Л. р. 165539

UNIVERSITET U BEOGRADU

BIROKOSKI FAKULTET

Analiza genetskih varijanti u hroničnoj
opstruktivnoj bolesti pluća kod čoveka

DOKTORSKA TEZA



Marja M. Stanković

Beograd, 2010

Apstrakt

Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) je složeno oboljenje u čiju etiologiju je uključen veliki broj genetičkih i sredinskih faktora, kao i njihovih interakcija. Pušenje predstavlja najznačajniji sredinski faktor rizika za HOBP. Smatra se da glavnu ulogu u patogenezi HOBP imaju geni uključeni u: metabolizam ksenobiotika, remodelovanje međucelijskog matriksa, inflamaciju i mukocilijarni klirens. Usled složene genetske osnove, multiplih interakcija faktora rizika, kao i populacione heterogenosti dosadašnji rezultati asocijativnih studija HOBP su nekonzistentni, a molekularni mehanizmi koji leže u osnovi HOBP nisu dovoljno rasvetljeni i predstavljaju izazov u istraživanju.

U ovoj studiji analizirane su odabrane funkcionalne varijante gena kandidata za patogenezu HOBP: CYPs (eng. Cytochromes), GSTs (glutation-S-transferaze), mEPHX (eng. Microsomal Epoxide Hydrolase), MMPs (eng. Matrix Metalloproteinases), α_1 AT (α_1 antitripsin), TNF α (eng. Tumor Necrosis Factor α) i CFTR (eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) kod bolesnika i kontrolnih subjekata. Cilj ove studije bio je identifikacija pojedinačnih i složenih faktora rizika udruženih sa HOBP kao i njihova funkcionalna analiza.

Rezultati ove studije su po prvi put pokazali udruženost genotipa TNF α -308GG sa HOBP (OR=2,44; p=0,036) i modulatorno dejstvo varijante CFTR 470V na težinu bolesti (OR=0,18; p=0,024). Identifikovan je i veći broj novih složenih genotipova, koji uključuju interakciju dva ili tri gena, i predstavljaju značajne faktore rizika za razvoj HOBP. Pojedinačni i složeni genotipovi koji su pokazali udruženost sa HOBP, ukazuju na važnost analize većeg broja gena kandidata i potencijal njihove dijagnostičke primene.

U ovoj studiji ustanovljeno je da prisustvo genotipa MMP9 -1562CT predstavlja faktor rizika za pojavu HOBP (OR=2,57; p=0,03) u interakciji sa duvanskim dimom. Na osnovu rezultata funkcionalne analize interakcije varijante C-1562T i duvanskog dima utvrđeno je da promotorska aktivnost alela C, nakon stimulacije, raste približno dva puta, a alela T približno tri puta. Duvanski dim ostvaruje stimulatorni efekat na obrazac odgovora varijante C-1562T gena MMP9, pri čemu alel T pokazuje veću osetljivost na dejstvo duvanskog dima u odnosu na alel C, čime se može objasniti povećana ekspresiju MMP9 koja karakteriše obolele od HOBP.

Rezultati ove studije potvrđuju važnost interakcije genetičkih i sredinskih faktora i definišu njihov odnos što doprinosi rasvetljavanju patogeneze HOBP i može biti korišćeno u prevenciji bolesti.

Ključne reči: HOBP, multifaktorijalna bolest, složeni genotip, interakcija genetičkih i sredinskih faktora, MMP9 C-1562T varijanta.

The first part of the paper discusses the general situation of the world economy in the early 1970s. It points out that the world economy is in a state of stagnation and that the growth rate of the world economy is very low. The second part of the paper discusses the situation of the world economy in the early 1980s. It points out that the world economy is in a state of recession and that the growth rate of the world economy is very low.

The third part of the paper discusses the situation of the world economy in the early 1990s. It points out that the world economy is in a state of recession and that the growth rate of the world economy is very low. The fourth part of the paper discusses the situation of the world economy in the early 2000s. It points out that the world economy is in a state of recession and that the growth rate of the world economy is very low.

The fifth part of the paper discusses the situation of the world economy in the early 2010s. It points out that the world economy is in a state of recession and that the growth rate of the world economy is very low. The sixth part of the paper discusses the situation of the world economy in the early 2020s. It points out that the world economy is in a state of recession and that the growth rate of the world economy is very low.

The seventh part of the paper discusses the situation of the world economy in the early 2030s. It points out that the world economy is in a state of recession and that the growth rate of the world economy is very low. The eighth part of the paper discusses the situation of the world economy in the early 2040s. It points out that the world economy is in a state of recession and that the growth rate of the world economy is very low.

The ninth part of the paper discusses the situation of the world economy in the early 2050s. It points out that the world economy is in a state of recession and that the growth rate of the world economy is very low. The tenth part of the paper discusses the situation of the world economy in the early 2060s. It points out that the world economy is in a state of recession and that the growth rate of the world economy is very low.

The eleventh part of the paper discusses the situation of the world economy in the early 2070s. It points out that the world economy is in a state of recession and that the growth rate of the world economy is very low. The twelfth part of the paper discusses the situation of the world economy in the early 2080s. It points out that the world economy is in a state of recession and that the growth rate of the world economy is very low.

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a complex disease, and many genetic and environmental factors, as well as their interactions are involved in its etiology. Smoking is regarded as the most important environmental risk factor for COPD. The genes that are involved in processes, such as metabolism of xenobiotics, extracellular matrix remodeling, inflammation and mucociliary clearance are anticipated to be involved in COPD pathogenesis. As a result of its complex genetic basis, multiple interactions of risk factors, as well as population heterogeneity, COPD association studies, so far, obtained controversial results, and molecular mechanisms lying in the basis of this disease are not completely elucidated, thus still representing a substantial research challenge.

In this study, selected functional variants of candidate genes for COPD pathogenesis were analysed. The following candidate genes: CYPs (Cytochromes), GSTs (Glutathione-S-Transferases), mEPHX (Microsomal Epoxide Hydrolase), MMPs (Matrix Metalloproteinases), α_1 AT (α_1 Antitrypsin), TNF α (Tumor Necrosis Factor α) and CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) were screened in patients and control groups. The aim of this study was to identify single and complex risk factors associated with COPD, as well as, to perform their functional analysis.

For the first time, our study identified the association of TNF α -308GG genotype with COPD (OR=2.44; p=0.036) and modifying role of CFTR 470V variant on COPD severity (OR=0.18; p=0.024). We have also reported several novel complex genotypes, that include interaction of two or three genes, and represent significant risk factors for COPD development. Single and complex genotypes that showed association with COPD have indicated the importance of the analysis of larger number of candidate genes and their potential diagnostic application.

We have shown that MMP9 -1562CT genotype, in interaction with cigarette smoke, represents significant risk factor for COPD development (OR=2.57; p=0.03). The functional analysis of C-1562T variant and cigarette smoke interaction revealed that promoter activity of allele C, after stimulation, was increased approximately two times, and in case of allele T approximately three times. Cigarette smoke had stimulating effect on the pattern of C-1562T variant response, and allele T showed greater sensitivity to cigarette smoke effect in comparison to allele C. These results might explain increased expression of MMP9 that characterise patients with COPD.

Results of our study pointed out the importance of genetic and environmental factors interaction, as well as determination of their relationship which contribute to elucidation of COPD pathogenesis and might be valuable in prevention of the disease.

Keywords: COPD, multifactorial disease, complex genotype, interaction of genetic and environmental factors, MMP9 C-1562T variant.

Zahvalnica

Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za molekularnu biologiju u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo pod rukovodstvom Dr Dragice Radojković.

Najpre želim da se zahvalim svojim mentorima i članovima komisije:

Dr Dragici Radojković na stalnim podsticajima, ukazanim prilikama i putevima tokom mog dosadašnjeg rada, kao i na podršci u realizaciji eksperimentalnih ideja, i savetima tokom pisanja ovog rada.

Dr Snežani Kojić na konstruktivnim rešenjima i angažovanju u eksperimentalnom radu i tokom pisanja ove teze, kao i na upućenoj pozitivnoj energiji i podršci.

Doc Dr Goranu Brajušković na značajnoj podršci u realizaciji ove teze.

Zahvaljujem se prof Dr Ani Savić i Dr Dragani Stefanović na ukazanom poverenju.

Zahvaljujem se kolegama Laboratorije 03 na podršci i razumevanju, i pored toga:

Vanjici na pomoći u eksperimentalnom radu, korekciji teksta ove teze i bezgraničnom optimizmu koji mi je uputila,

Alex i Saški na važnom doprinosu u inicijalnom osmišljavanju ove teze,

Jeleni na angažovanju u prikupljanju uzoraka i uvek dobroj šali u našem labu,

Lili na ažurnom eksperimentalnom rešenju za detekciju jedne od MMP i korisnim razgovorima,

Aleki na svim iznenadnim eksperimentalnim manevrima u kojima je učestvovala i na ćaskanju o temama koje unose život u svakodnevnu radnu atmosferu,

Mili i Branku na razumevanju i predusretljivosti,

Ivi i Đoletu na zanimljivim razgovorima,

i mojoj drugarici Sandri na ohrabrenju, pozitivnim mislima i optimizmu.

Posebno bih se zahvalila:

Dr Marini Lušić na poklonu ćelijske linije U937, kao i na svim dobronamernim savetima.

Dr Andriji Tomović na realizaciji svih statističkih akrobacija koje su mi pale napamet.

Dr Ivani Strahinić i Dr Ivani Morić na izuzetnom angažovanju u prikupljanju uzoraka.

Mr Aleksandru Krstić na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu.

Dr Mariji Mitić-Milikić, Dr Nataši Petrović-Stanojević i Dr Vesni Dopuđa-Pantić, kao najangažovanijim saradnicima, na uloženom trudu, dobrom odabiru pacijenata i stručnoj literaturi.

Zahvaljujem se svojim roditeljima Miletu i Gordani, i mojoj Dinki, na ohrabrenjima, brizi i pozitivnim emocijama, kao i Ivanu, Jaci, Aleksi i Leni.

Izuzetnu zahvalnost osećam prema najplemenitijem ujaku Dušanu Stanković (1940-2008), za svu njegovu podršku i zainteresovanost, kao i prema Olji, Jeci, Veci i Vladi.

Zahvaljujem se porodici Živković na podršci.

Zahvaljujem se svojim dragim sestrama Bilji i Ceci, i tetki Nataliji na ohrabrenjima i najsladim malim ugođajima, kao i našoj drugarici Vesni.

Želim da se zahvalim svojim dragim prijateljima Olji i Đoletu na podršci i interesovanju i što su uvek tu kada je potrebno.

Takođe želim da pomenem svoju drugaricu Tijanu Savić (1977-2008) zahvaljujući kojoj smo zajedno započele rad na Institutu 2003. godine.

Period pisanja ove teze su posebno obeležile dve meni veoma drage osobe koje su mi ulile izuzetnu snagu i optimizam. Zahvaljujem se mom drugaru Boki na šarmantnoj brizi o svim mojim sitnim problemima, komičnim rešenjima i kosmičkoj poetici. Svojoj dragoj prijateljici Marici želim da zahvalim na nesvakidašnjoj inspiraciji, malim tajnama i savetima, i pozitivnim mislima.

Beograd,
decembar 2010.

Lista skraćenica

ADAM - eng. A Disintegrin and Metalloprotease
AHR - eng. Aryl Hydrocarbon Receptor
AHRR - eng. Aryl Hydrocarbon Receptor Represor
AKT - eng. Akt Kinase
ALB - albumin
AP - eng. Activator Protein
APS - amonijum-persulfat
ARNT - eng. Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ASK - eng. Apoptosis Signal Regulating Kinase
ASL - eng. Airway Surface Liquid
BAL - bronhoalveolarni lavat
BP - benzo(a)piren
CCL - CC hemokin ligand
CF - cistična fibroza
CFTR - eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CRP - C reaktivni protein
CSC - eng. Cigarette Smoke Condensate
CSGE - eng. Conformation Sensitive Gel Electrophoresis
CXC - receptor hemokina
CXCL - CXC hemokin ligand
CYP - eng. Cytochrome
ddNTP - dideoksiribonukleotidtrifosfat
DGGE - eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMSO - dimetil-sulfoksid
DNK - dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP - dezoksiribonukleotidtrifosfat
EGF - eng. Epidermal Growth Factor
EGR - eng. Early Growth Response Protein
ENaC - eng. Epithelial Na Channel
ERK - eng. Extracellular Signal Regulated Kinase
ERV - ekspiratorni rezervni volumen
ETS - eng. E-Twenty Six
FCS - eng. Fetal Calf Serum
FEF - eng. Forced Expiratory Flow
FEV₁ - forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi
FMN - flavin monooksigenaza
FRC - eng. Functional Residual Capacity
FVC - eng. Forced Vital Capacity
GAPDH - gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza
GATA - eng. Globin Transcription Factor
GM-CSF - eng. Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GSH - redukovani glutation
GSK - eng. Glycogen Synthase Kinase
GSSG - oksidovani glutation

GST - glutation-S-transferaza
GWAS - eng. Genome Wide Association Study
HAT - eng. Histone Acetyltransferase
HDA - eng. Histone Deacetylase
HES - eng. Homologues of Enhancer of Split
HIV - eng. Human Immunodeficiency Virus
HO - eng. Heme Oxygenase
HOBP - hronična opstruktivna boleť pluća
HSV - eng. Herpes Simplex Virus
IC - eng. Inspiratory Capacity
IKK - eng. Inhibitor of NF κ B Kinase
IL - interleukin
IPTG - izopropil-D-1-tiogalaktopiranozid
iRNK - informaciona RNK
IRV - inspiratorni rezervni volumen
JNK - eng. c Jun N Terminal Kinase
KEAP - eng. Kelch Like Erythroid Cell Derived Protein with CNC Homology Associated Protein
LAR - eng. Luciferase Assay Reagent
LB - Luria-Bertani
LT - leukotrien
LTR - eng. Long Terminal Repeat
MAP - eng. Mitogen Activated Protein
MAPK - eng. MAP Kinase
MEK - eng. MAP Kinase Kinase
MEKK - eng. MAP/ERK Kinase Kinase
mEPHX - eng. Microsomal Epoxide Hydrolase
MHC - eng. Major Histocompatibility Complex
MKK - eng. MAP Kinase Kinase
MMP - eng. Matrix Metalloproteinase
MTT - dimetiltiazol-difeniltetrazolijum-bromid
NF κ B - eng. Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells
NRF2 - eng. Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor
OD - eng. Optical Density
OR(CI) - eng. Odds Ratio (Confidence Interval)
PAGE - eng. Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAU - policiklični aromatični ugljovodonik
PBS - fosfatni pufer
PCR - eng. Polymerase Chain Reaction
PI3C - eng. Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKC - protein kinaza C
PLB - eng. Passive Lysis Buffer
PMA - eng. Phorbol-12-myristate-13-acetate
POZ - eng. Poxvirus and Zinc Finger
PSM - eng. PCR-Mediated Site Directed Mutagenesis
RAV - reaktivna azotna vrsta
REF - eng. Redox Factor

RFLP - eng. Restriction Fragment Length Polymorphism
RKV - reaktivna kiseonična vrsta
RNK - ribonukleinska kiselina
RV - rezidualni volumen
SDS - eng. Sodium Dodecyl Sulfate
SEM - eng. Standard Error of Mean
SERPIN - eng. Serine Protease Inhibitor
SNP - eng. Single Nucleotide Polymorphism
SOD - superoksid dismutaza
SPSS - eng. Statistical Package for Social Sciences
STAT - eng. Signal Transducer and Activator of Transcription
TAE - tris-acetatni pufer
TBE - tris-boratni pufer
TEMED - tetrametil-etilendiamin
TG - tris-glicinski pufer
TGF β - eng. Transforming Growth Factor β
TH - T Helper ćelija
TIMP - eng. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TK - timidin knaza
TLC - eng. Total Lung Capacity
TLE - eng. Transducin Like Enhancer of Split
TNF α - eng. Tumor Necrosis Factor α
TPA - eng. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
TTE - tris-aurinski pufer
TV - eng. Tidal Volume
VEGF - eng. Vascular Endothelial Growth Factor
wt - eng. Wild Type
X-Gal - 5-bromo-4-hloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid
 γ GSC - γ glutamil-cistein sintetaza
 α_1 AT - α_1 antitripsin

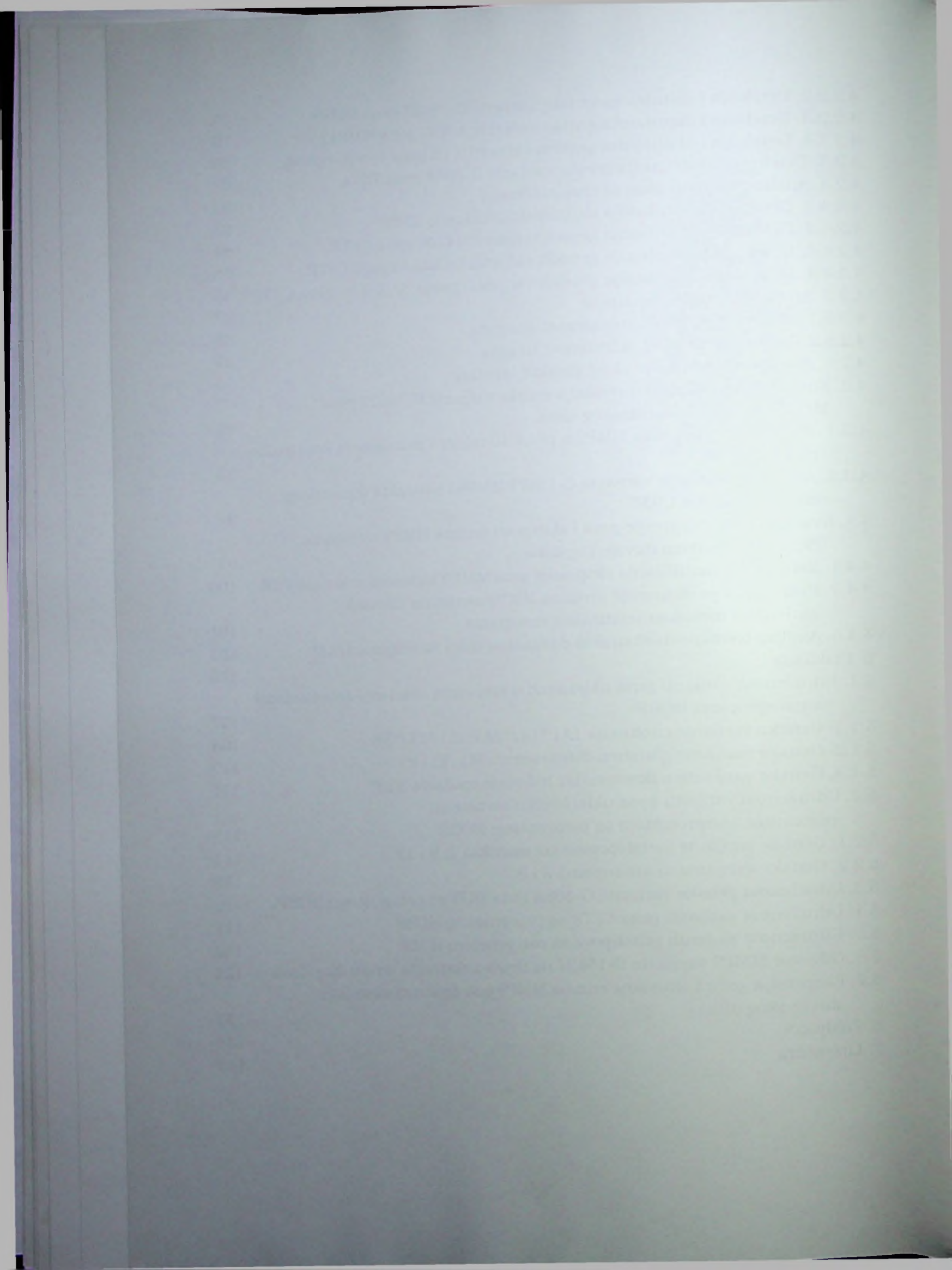
1111	...	1111
1112	...	1112
1113	...	1113
1114	...	1114
1115	...	1115
1116	...	1116
1117	...	1117
1118	...	1118
1119	...	1119
1120	...	1120
1121	...	1121
1122	...	1122
1123	...	1123
1124	...	1124
1125	...	1125
1126	...	1126
1127	...	1127
1128	...	1128
1129	...	1129
1130	...	1130
1131	...	1131
1132	...	1132
1133	...	1133
1134	...	1134
1135	...	1135
1136	...	1136
1137	...	1137
1138	...	1138
1139	...	1139
1140	...	1140
1141	...	1141
1142	...	1142
1143	...	1143
1144	...	1144
1145	...	1145
1146	...	1146
1147	...	1147
1148	...	1148
1149	...	1149
1150	...	1150
1151	...	1151
1152	...	1152
1153	...	1153
1154	...	1154
1155	...	1155
1156	...	1156
1157	...	1157
1158	...	1158
1159	...	1159
1160	...	1160
1161	...	1161
1162	...	1162
1163	...	1163
1164	...	1164
1165	...	1165
1166	...	1166
1167	...	1167
1168	...	1168
1169	...	1169
1170	...	1170
1171	...	1171
1172	...	1172
1173	...	1173
1174	...	1174
1175	...	1175
1176	...	1176
1177	...	1177
1178	...	1178
1179	...	1179
1180	...	1180
1181	...	1181
1182	...	1182
1183	...	1183
1184	...	1184
1185	...	1185
1186	...	1186
1187	...	1187
1188	...	1188
1189	...	1189
1190	...	1190
1191	...	1191
1192	...	1192
1193	...	1193
1194	...	1194
1195	...	1195
1196	...	1196
1197	...	1197
1198	...	1198
1199	...	1199
1200	...	1200

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Respiratorni sistem	1
1.1.1. Građa i funkcija	1
1.1.2. Procena funkcije pluća	3
1.2. Hronična opstruktivna bolest pluća	5
1.2.1. Klinički parametri	5
1.2.2. Patofiziološki mehanizmi hronične opstruktivne bolesti pluća	6
1.2.3. Uloga faktora spoljašnje sredine u hroničnoj opstruktivnoj bolesti pluća	8
1.2.3.1. Duvanski dim	8
1.2.3.1.1. Duvanskim dimom indukovani razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća	9
1.2.3.2. Aerozagađenje	11
1.2.4. Uloga genetičkih faktora u razvoju hronične opstruktivne bolesti pluća	12
1.2.4.1. Proteinaze i antiproteinaze	15
1.2.4.1.1. α_1 Antitripsin	15
1.2.4.1.2. Metaloproteinaze matriksa	16
1.2.4.1.2.1. Metaloproteinaza matriksa 1, 9 i 12	17
1.2.4.1.3. Drugi geni povezani sa neravnotežom proteinaze-antiproteinaze	19
1.2.4.2. Oksidanti i antioksidanti	19
1.2.4.2.1. Citohrom P-450	21
1.2.4.2.1.1. Citohrom 1A1 i 2E1	21
1.2.4.2.2. Glutation-S-transferaze	23
1.2.4.2.2.1. Glutation-S-transferaza M1, T1 i P1	23
1.2.4.2.3. Mikrozomalna hidrolaza epoksida	24
1.2.4.2.4. Drugi geni povezani sa neravnotežom oksidanti-antioksidanti	25
1.2.4.3. Inflamatorni procesi	25
1.2.4.3.1. Faktor nekroze tumora α	27
1.2.4.3.2. Drugi geni povezani sa inflamatornim procesima	27
1.2.4.4. Mukocilijarni klirens	28
1.2.4.4.1. Regulator provodljivosti u cističnoj fibrozi	30
2. Cilj	31
3. Materijal i metode	33
3.1. Ispitanici	33
3.2. Materijal	33
3.2.1. Uzorci periferne krvi	33
3.2.2. Čelijska linija	34
3.2.3. Bakterijski sojevi	34
3.2.4. Plazmidni vektori	34
3.2.5. Oligonukleotidi	36
3.2.6. Ekstrakt duvanskog dima	37
3.2.7. Forbol miristat acetat	37
3.3. Metode	38
3.3.1. Izolovanje nukleinskih kiselina	38
3.3.1.1. Izolovanje genomske DNK	38

3.3.1.2. Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali	38
3.3.1.3. Izolovanje plazmidne DNK na velikoj skali	39
3.3.1.4. Izolovanje totalne RNK	41
3.3.2. Sinteza cDNK	41
3.3.3. Metode za detekciju genskih varijanti	42
3.3.3.1. Reakcija lančanog umnožavanja DNK	43
3.3.3.2. Metoda polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata	43
3.3.3.3. Metoda specifične mutageneze posredstvom PCR reakcije	46
3.3.3.4. Digestija PCR fragmenata	46
3.3.3.5. Konformaciono senzitivna gel elektroforeza	46
3.3.3.6. Elektroforeza u gelu sa gradijentom denaturišućeg agensa	47
3.3.4. Elektroforeza nukleinskih kiselina u agaroznom gelu	49
3.3.5. Bojenje poliakrilamidnih gelova srebro-nitratom	49
3.3.6. Prečišćavanje DNK iz rastvora	50
3.3.7. Prečišćavanje DNK iz agaroznog gela	50
3.3.8. Digestija plazmidne DNK	51
3.3.9. Reakcija ligacije DNK	51
3.3.10. Sekvenciranje DNK	52
3.3.11. <i>In situ</i> PCR dirigovana mutageneza	54
3.3.12. Kultivisanje bakterija	56
3.3.12.1. Priprema kompetentnih ćelija <i>E. Coli</i>	56
3.3.12.2. Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija	57
3.3.12.3. Čuvanje transformanata	57
3.3.13. Kultura ćelija	58
3.3.14. Tranzijentna transfekcija ćelija u suspenziji	60
3.3.15. Tretman ćelija ekstraktom duvanskog dima	61
3.3.16. Luciferazni esej	62
3.3.17. Real-time PCR metoda	63
3.3.18. Metoda želatinskog zimograma	65
3.3.18.1. Seminativna elektroforeza proteina	66
3.3.18.2. Razvijanje želatinskog zimograma	66
3.3.18.3. Bojenje proteina u gelu	67
3.3.19. Određivanje vijabilnosti ćelija	67
3.3.19.1. Određivanje broja živih ćelija bojenjem tripan plavim	67
3.3.19.2. MTT test	68
3.3.20. Statistička obrada podataka	68
4. Rezultati	70
4.1. Ispitanici	70
4.2. Analiza funkcionalnih genskih varijanti	71
4.2.1. Analiza varijanti gena uključenih u ravnotežu oksidanti-antioksidanti	73
4.2.1.1. Detekcija i distribucija genske varijante *1A/*2A gena CYP1A1	73
4.2.1.2. Detekcija i distribucija genske varijante *1A/*5B gena CYP2E1	74
4.2.1.3. Detekcija i distribucija genskih varijanti u genima GSTM1, GSTT1 i GSTP1	75
4.2.1.4. Detekcija i distribucija genskih varijanti S i F gena mEPHX	77
4.2.2. Analiza varijanti gena uključenih u ravnotežu proteinaze-antiproteinaze	78
4.2.2.1. Detekcija i distribucija genske varijante G-1607GG gena MMP1	78

4.2.2.2. Detekcija i distribucija genske varijante C-1562T gena MMP9	79
4.2.2.3. Detekcija i distribucija genske varijante A-82G gena MMP12	79
4.2.2.4. Detekcija i distribucija genskih varijanti Z i S gena α_1 antitripsin	80
4.2.3. Detekcija i distribucija genske varijante G-308A gena TNF α	82
4.2.4. Analiza varijanti gena za cističnu fibrozu	83
4.2.4.1. Detekcija i distribucija mutacije F508del gena CFTR	83
4.2.4.2. Detekcija i distribucija genske varijante M470V gena CFTR	84
4.2.4.3. Detekcija i distribucija genskih varijanti Tn lokusa gena CFTR	85
4.2.4.4. Detekcija i distribucija genskih varijanti egzona 3, 10 i 11 gena CFTR	86
4.2.5. Analiza složenih genotipova	87
4.2.5.1. Složeni genotipovi, udruženost dva gena	88
4.2.5.2. Složeni genotipovi, udruženost tri gena	89
4.2.6. Analiza modulatorne uloge genskih varijanti	90
4.3. Funkcionalna analiza interakcije genske varijante C-1562T gena MMP9 i ekstrakta duvanskog dima	94
4.3.1. Kloniranje promotora MMP9 u pGL4.10 vektor i mutageneza konstrukta pGL-pMMP9	95
4.3.2. Analiza interakcije varijante C-1562T MMP9 i ekstrakta duvanskog dima u ćelijama U937	97
4.4. Kvantifikacija ekspresije gena i aktivnosti enzima MMP9 u ćelijama U937 pod dejstvom duvanskog dima	99
4.4.1. Relativna kvantifikacija ekspresije gena MMP9 metodom real-time PCR	100
4.4.2. Kvantifikacija ekspresije proteina MMP9 merenjem enzimске aktivnosti metodom želatinskog zimograma	101
4.4.3. Analiza toksičnosti ekstrakta duvanskog dima na ćelijama U937	103
5. Diskusija	106
5.1. Udruženost varijanti gena uključenih u ravnotežu oksidanti-antioksidanti sa patogenezom HOBP	107
5.1.1. Genske varijante citohroma 1A1 *1A/*2A i 2E1 *1A/*5B	108
5.1.2. Genske varijante glutation-S-transferaza M1, T1 i P1	110
5.1.3. Genske varijante mikrozomalne hidrolaze epoksida S i F	111
5.2. Udruženost varijanti gena uključenih u ravnotežu proteinaze-antiproteinaze sa patogenezom HOBP	113
5.2.1. Genske varijante metaloproteinaza matriksa 1, 9 i 12	113
5.2.2. Genske varijante α_1 antitripsina Z i S	115
5.3. Udruženost genske varijante G-308A gena TNF α sa patogenezom HOBP	116
5.4. Udruženost varijanti gena CFTR sa patogenezom HOBP	117
5.5. Udruženost složenih genotipova sa patogenezom HOBP	119
5.6. Odgovor MMP9 varijante C-1562T na dejstvo ekstrakta duvanskog dima	128
5.7. Ekspresija gena i aktivnost enzima MMP9 pod dejstvom ekstrakta duvanskog dima	133
6. Zaključci	138
7. Literatura	140

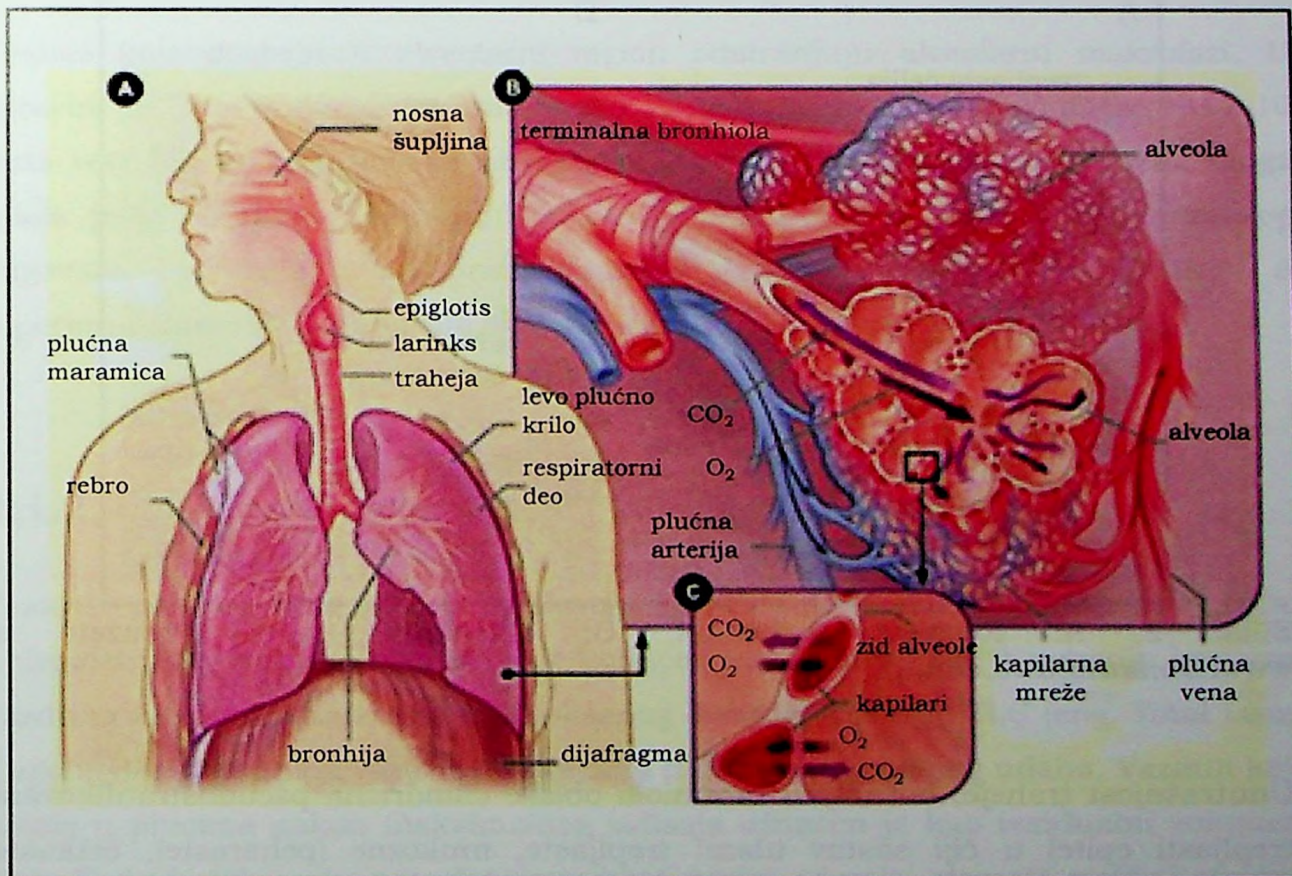


1. Uvod

1.1. Respiratorni sistem

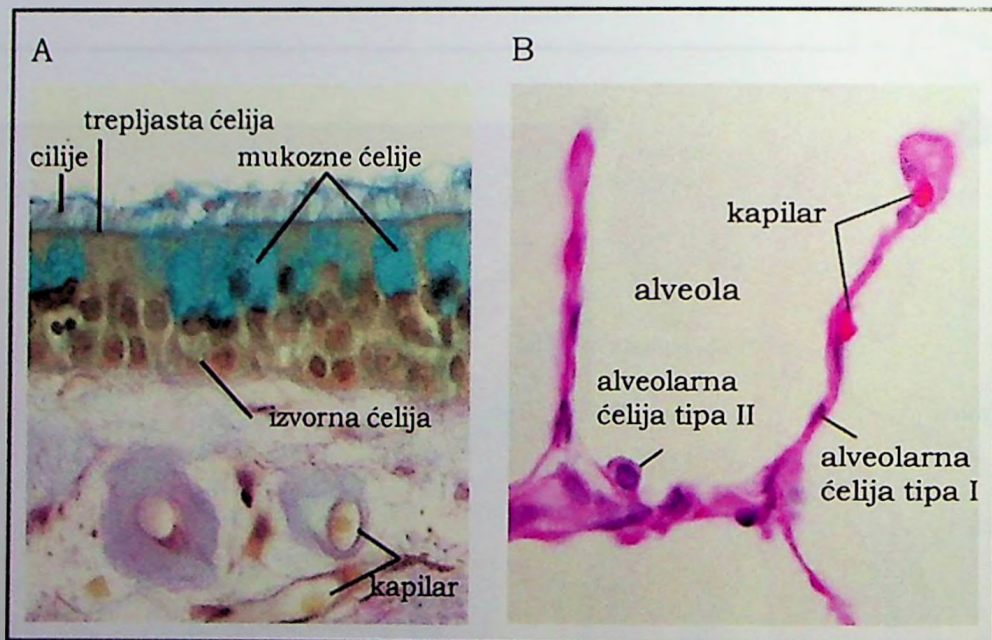
1.1.1. Građa i funkcija

Osnovna funkcija respiratornog sistema jeste snabdevanje ćelija kiseonikom iz vazduha i uklanjanje ugljen-dioksida iz krvotoka. Respiratorni sistem se sastoji iz sprovodnog i respiratornog dela. Sprovodni deo počinje nosnim šupljinama, zatim slede farinks, traheja sa larinksom, bronhije i manje bronhiole (Slika 1A). Respiratorni deo pluća obuhvata strukture distalno od terminalne bronhiole. Disanje je aktivan proces koji zahteva kontrakciju spoljašnjih interkostalnih mišića i dijafragme kada vazduh struji u pluća (inspirijum), a pri njihovoj relaksaciji vazduh struji napolje (ekspirijum).



Slika 1. A: osnovna građa respiratornog sistema; B: respiratorni putevi, alveole i kapilari; C: razmena gasova preko aleveolarno-kapilarne barijere. Preuzeto sa www.rationalmd.com.

Traheja se sastoji od 15-20 hrskavičavih prstenova, i grana se u dve bronhije koje se zatim nepravilno i dihotomno granaju na manje bronhije. Granjanjem bronhija dolazi do povećanja poprečnog preseka disajnih puteva što smanjuje otpor i brzinu protoka vazduha. Završne segmente disajnih puteva čine terminalne bronhiole koje se granaju u 2-4 respiratorne bronhiole koje završavaju alveolarnim duktusima čiji su zidovi sačinjeni od alveola. Osnovnu jedinicu građe pluća čini acinus u čiji sastav ulazi jedna terminalna bronhiola sa respiratornim bronhiolama i alveolama. Otvor alveole koji čini alveolarni duktus sadrži kolagena i elastična vlakna, a susedne alveole su međusobno spojene snopovima kolagenih vlakana. Svaka alveola je okružena mrežom kapilara (Slika 1B). Alveole su osnovne morfofunkcionalne jedinice u kojima se odvija razmena gasova (Slika 1C). Pluća čoveka sadrže oko 500 miliona alveola. Pluća su podeljena na tri lobusa u desnom i dva lobusa u levom plućnom krilu, i normalno imaju 10 segmenata u desnom i 8 u levom krilu (Cecil et al. 2007).



Slika 2. A: Respiratorni epitel; B: alveolarni epitel. Preuzeto sa www.lab.anhb.uwa.edu.au.

Unutrašnjost traheje, bronhija i bronhiola oblaže cilindrični, pseudostratifikovani, trepljasti epitel u čiji sastav ulaze: trepljaste, mukozne (peharaste), četkaste, endokrine i izvorne ćelije (Slika 2A) (Šerban 1995). Disajni putevi čoveka su prekriveni mukoznim slojem, poreklom od mukoznih ćelija i mukoznih žlezda (Šerban 1995, Popović i sar. 1988). Trepljaste ćelije sinhronizovanim udarima cilija

upućuju mukusni pokrivač i u njemu zarobljene čestice ka farinksu gde biva progutan ili iskašljan (Cecil et al. 2007).

Epitelne ćelije alveola obuhvataju alveolarne ćelije tipa I (pneumocite tipa I) i alveolarne ćelije tipa II (pneumocite tipa II) (Slika 2B) (Šerban 1995). Alveolarne ćelije tipa I su uključene u razmenu gasova koja se odigrava u alveolama, dok su alveolarne ćelije tipa II odgovorne za produkciju i sekreciju surfaktanta. Surfaktant je izgrađen od fosfatidilholina, glikoproteina i dipalmitoil lecitina.

Alveolarno-kapilarnu barijeru čine: sloj surfaktanta, alveolarna ćelija tipa I, podepitelska lamina i endotelska ćelija kapilara. U oblasti alveolarno-kapilarne barijere, obavlja se razmena gasova procesom pasivne difuzije. Kod zdravog čoveka ukupna površina alveola iznosi oko 100 m², a u plućnim kapilarima nalazi se približno 200 mL krvi (Cecil et al. 2007).

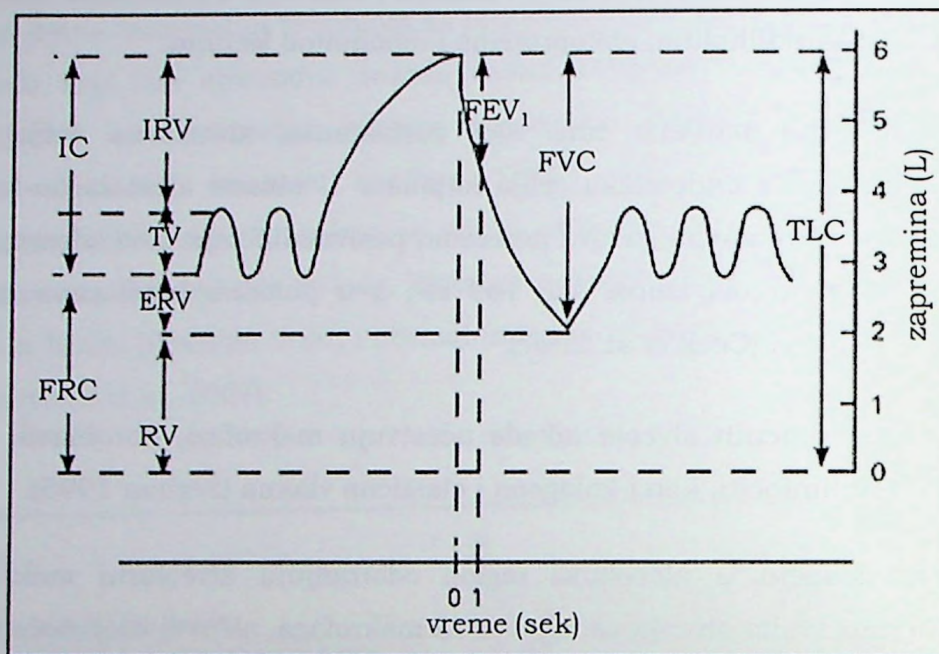
U izgradnji zida plućnih alveola takođe učestvuju makrofazi, fibroblasti, mišićne ćelije, mastociti, limfociti, kao i kolagena i elastična vlakna (Šerban 1995).

Čestice koje dospeju u alveolarni region odstranjuju alveolarni makrofazi. U zdravim plućima svaka alveola sadrži oko 12 makrofaga, ali ovaj broj može biti 2-10 puta veći kod pušača i osoba izloženih visokom stepenu zagađenja. Važna uloga pluća jeste da čiste i prerađuju udahnute alergene bez pojačavanja imunskog odgovora. Poremećaj regulatornih imunskih mehanizama može imati ulogu u hiperimunskim i inflamatornim bolestima pluća (Cecil et al. 2007).

1.1.2. Procena funkcije pluća

Testovi plućne funkcije omogućavaju objektivno merenje funkcije pluća. Spirometrijsko ispitivanje je najčešće korišćen test, a sastoji se u merenju kretanja vazduha kroz pluća za vreme kontrolisanog disanja (Slika 3). TLC (eng. Total Lung Capacity) je zapremina vazduha u plućima nakon maksimalnog udaha. Vazduh koji ostaje u plućima nakon maksimalnog izdisaja označen je kao rezidualni volumen (RV). Kod zdravih osoba navedeni parametri zavise od pola, starosti, visine i etničke pripadnosti (Cecil et al. 2007).

Najkorisniji spirometrijski parametri su: FVC (eng. Forced Vital Capacity) koji predstavlja najveću zapreminu vazduha koja se izduva iz pluća tokom forsiranog izdaha počevši od TLC, forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV_1), i odnos FEV_1/FVC (Slika 3). Testovi plućne funkcije se koriste za dijagnostiku osnovnih oblika plućnih bolesti, procenu težine bolesti kao i praćenje njenog toka.



Slika 3. Plućni volumeni i kapaciteti. Preuzeto sa www.nature.com.

IC-eng. Inspiratory Capacity; FRC-eng. Functional Residual Capacity; IRV-inspiratorni rezervni volumen; TV-eng. Tidal Volume; ERV-ekspiratorni rezervni volumen; RV-rezidualni volumen; FEV_1 -forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi; FVC-eng. Forced Vital Capacity; TLC-eng. Total Lung Capacity.

Pad vrednosti FEV_1/FVC često predstavlja prvi znak razvoja bronhoopstrukcije. Vrednost FEV_1 opada sa godinama, ali je stopa opadanja kod bolesnika sa hroničnom opstruktivnom bolesti pluća (HOBP) veća nego kod zdravih osoba. FEV_1 kod nepušača opada 20 do 40 mL godišnje, a kod pušača dva do četiri puta više. Kod pušača mladih od 35 godina, sa prestankom pušenja može doći do poboljšanja plućne funkcije, dok se kod pušača starijih od 35 godina nakon prestanka pušenja usporava pad plućne funkcije (Cecil et al. 2007).

Kapacitet difuzije pluća se definiše kao sposobnost pluća da prenesu udahnuti, nereaktivni gas kao što je ugljen-monoksid. Ugljen-monoksid koji dospe do alveola, prolazi aleveolarno-kapilarnu barijeru, dospeva do eritrocita i vezuje se za hemoglobin sa velikim afinitetom i uklanja iz izdahnutog vazduha. (Cecil et al. 2007).

1.2. Hronična opstruktivna bolest pluća

1.2.1. Klinički parametri

HOBP karakteriše ograničeni protok vazduha kroz disajne puteve koji nije potpuno reverzibilan. Ovo ograničenje protoka vazduha je obično progresivno i udruženo sa abnormalnim inflamatornim odgovorom pluća na delovanje štetnih čestica i gasova, naročito onih poreklom iz duvanskog dima (GOLD 2006). HOBP obuhvata: hronični opstruktivni bronhitis i emfizem pluća. Hronični opstruktivni bronhitis se karakteriše prisustvom produktivnog kašlja koji traje najmanje tri meseca, tokom svake od dve uzastopne godine, i nije obavezno povezan sa ograničenim protokom vazduha. Emfizem pluća se anatomski definiše trajnim povećanjem vazdušnog prostora distalno od terminalne bronhiole, destrukcijom plućnog parenhima, gubitkom elastične retraktilnosti pluća i zatvaranjem malih disajnih puteva. Kod većine obolelih od HOBP istovremeno su prisutni hronični bronhitis i emfizem (Filipović i sar. 2006).

HOBP je vodeći uzrok mortaliteta i morbiditeta u populaciji odraslih širom sveta. Globalna učestalost ove bolesti se kreće između 4 i 10% (Halbert et al. 2003). Predviđanja ukazuju da će do 2020 godine, HOBP postati treći po redu uzrok smrti širom sveta (Lopez et al. 1998).

Teška deficijencija α_1 antitripsina (α_1 AT) je, do sada, najbolje opisani genetički faktor rizika za nastanak HOBP. U glavne faktore spoljašnje sredine spadaju duvanski dim, prašina i hemikalije iz radnog okruženja, aerozagađenje, infekcije i socioekonomski status (GOLD 2006). Pušenje je najvažniji etiološki faktor koji dovodi do razvoja HOBP i procenjuje se da 10-20% pušača razvije HOBP (Fletcher et al. 1977).

Spirometrija je zlatni standard za dijagnostifikovanje i procenu HOBP. Prema kriterijumima propisanim od strane Evropskog respiratornog društva dijagnoza HOBP uključuje 4 stadijuma bolesti:

I stadijum-blaga HOBP: sa vrednostima $FEV_1/FVC < 70\%$ i $FEV_1 \geq 80\%$ od predviđene vrednosti za pol, starost i visinu (u daljem tekstu predviđena vrednost), koji karakteriše blago ograničenje protoka vazduha kroz disajne puteve, ali ne uvek produktivni kašalj.

II stadijum-umerena HOBP: sa vrednostima $FEV_1/FVC < 70\%$ i $50 \leq FEV_1 < 80\%$ od predvidene vrednosti, koji karakteriše pogoršanje ograničenog protoka vazduha kroz disajne puteve i kratak dah.

III stadijum-teška HOBP: sa vrednostima $FEV_1/FVC < 70\%$ i $30 \leq FEV_1 < 50\%$ od predvidene vrednosti, koji karakteriše dalje pogoršanje ograničenog protoka vazduha kroz disajne puteve, i još kraći dah, smanjen kapaciteta za fizičku aktivnost i ponavljana pogoršanja.

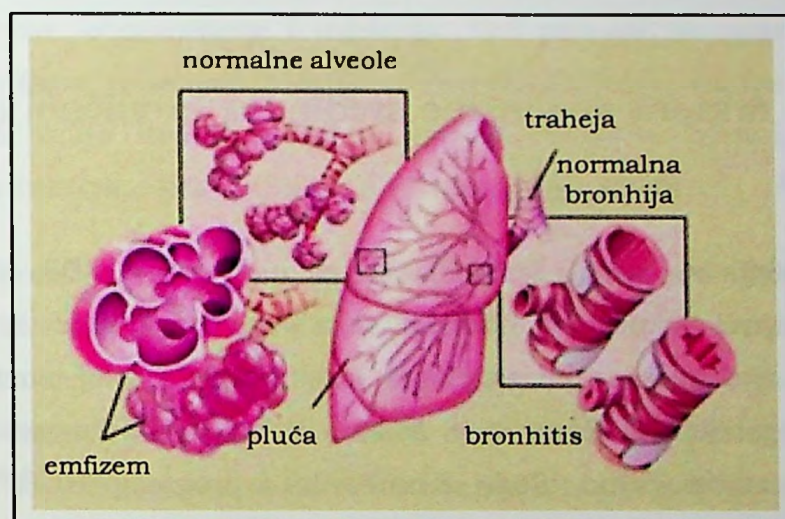
IV stadijum-veoma teška HOBP: sa vrednostima $FEV_1/FVC < 70\%$ i $FEV_1 < 30\%$ od predvidene vrednosti, uz hroničan pad funkcije pluća. Ovaj stadijum karakteriše znatno oštećenje kvaliteta života, a pogoršanja mogu rezultirati smrtnim ishodom.

1.2.2. Patofiziološki mehanizmi hronične opstruktivne bolesti pluća

Kašalj i produkcija sputuma, koji karakterišu hronični bronhitis, predstavljaju nespecifičan odgovor disajnih puteva na delovanje toksičnih čestica i gasova iz duvanskog dima. U epitelu centralnih disajnih puteva (traheja, bronhije i bronhiole) prisutna je inflamacija koja se preko žlezdanih kanala širi do sluznih žlezda. Hronični bronhitis je, takođe, udružen sa povećanjem bronhijalnih mukusnih žlezda i zadebljanjem bronhijalnog zida usled povećanog taloženja elemenata vezivnog tkiva. Pored povećane produkcije sluzi, javlja se poremećaj mukocilijarnog klirensa i oštećenje epitelijalne barijere disajnih puteva (Slika 4) (Filipović i sar. 2006).

Prema načinu nastanka oštećenja acinusa, emfizem se deli na: centroacinusni (centrolobularni) i panacinusni (panlobularni). Centroacinusni emfizem nastaje kao rezultat dilatacije i destrukcije respiratornih bronhiola, pri čemu područje emfizema okružuje normalni plućni parenhim, dok je kod panacinusnog emfizema čitav acinus uniformno zahvaćen. Centroacinusni emfizem je najčešći oblik emfizema koji se sreće kod pušača (Kim et al. 1991). Panacinusni emfizem javlja se relativno rano i obično je udružen sa deficijencijom α_1AT (Slika 4) (Kim et al. 1991, Filipović i sar. 2006).

Opstrukcija protoka vazduha tokom ekspirijuma predstavlja ključnu fiziološku karakteristiku HOBP. Opstrukcija je primarno ireverzibilna i rezultat je remodelovanja, fibroze i opstrukcije malih disajnih puteva (terminalne bronhiole), što dovodi do fiksne bronhoopstrukcije i porasta otpora u disajnim putevima. Povećanje otpora u perifernim disajnim putevima javlja se usled gubitka elastičnosti i destrukcije alveolarnih veza što rezultira gubitkom podrške i zatvaranjem malih disajnih puteva tokom ekspirijuma. Do suženja malih disajnih puteva dolazi usled infiltracije inflamatornih ćelija, strukturnih promena usled povećanja mase glatkih mišića, fibroze i prisustva čepova mukusa (Filipović i sar. 2006).



Slika 4. Promene u plućima kod hroničnog bronhitisa i emfizema. Preuzeto sa www.mayoclinic.com.

Opisani patofiziološki procesi su povezani i mogu biti aktivirani dejstvom duvanskog dima i udisanjem štetnih čestica i gasova. Suženje malih disajnih puteva dovodi do hiperinflacije pluća, koja nisu u stanju da se prazne, što se klinički manifestuje dispnejom, koja je sa progresijom bolesti prisutna i tokom mirovanja. Bronhoopstrukcija se najbolje određuje pomoću spirometrije koja ima ključnu ulogu u dijagnozi i terapiji bolesti.

Mada primarno pogađa pluća, HOBP ostvaruje značajne sistemske posledice koje dovode do opšte slabosti organizma i imaju negativan uticaj na kvalitet života obolelih. Jedna od najvažnijih sistemskih karakteristika HOBP je inflamacija koja najviše pogađa srce, krvne sudove i skeletne mišiće (Filipović i sar. 2006, Chung et al. 2008).



Akutno pogoršanje (egzacerbacija) HOBP se definiše kao pojačanje simptoma bolesti: dispneje, kašlja, produkcije i purulencije sputuma, koji traju duže od 24 časa ali kraće od dve nedelje. Smatra se da pojačana inflamacija u disajnim putevima ima glavnu ulogu u patogenezi akutnih egzacerbacija (Filipović i sar. 2006).

HOBP je neizlečiva bolest. Plućna funkcija zdravih osoba se smanjuje sa starošću, ali je to smanjenje znatno brže kod pušača sa ovom bolešću. Osnovna preporuka pacijentima sa HOBP je da ukoliko su pušači prestanu sa pušenjem, a ukoliko ne puše da ne počinju. HOBP se leči primenom bronhodilatatora, antibiotika i kortikosteroida u slučajevima teških pogoršanja (Cecil et al. 2007).

1.2.3. Uloga faktora spoljašnje sredine u hroničnoj opstruktivnoj bolesti pluća

Pušenje predstavlja najvažniji faktor rizika za nastanak HOBP. Međutim, i drugi faktori, uključujući izloženost štetnim faktorima spoljašnje sredine i radnog okruženja su značajni za patogenezu ove bolesti. Izloženost infektivnim i neinfektivnim agensima tokom rane životne dobi, kao i socioekonomski status takođe mogu imati značajnu ulogu u nastanku i progresiji HOBP (Stockley et al. 2009).

1.2.3.1. Duvanski dim

Duvanski dim sadrži više od 4700 hemijskih jedinjenja pri čemu su slobodni radikali i drugi oksidanti prisutni u visokoj koncentraciji. Slobodni radikali su prisutni u katranu i u gasnoj fazi duvanskog dima. Gasna faza sadrži 10^{15} slobodnih radikala po udahnutom dimu, a među njima i azot-monoksid (NO) koji sa superoksid anjonom (O_2^-) stvara peroksinitrit i alkil-peroksinitrit. Faza katrana sadrži veliki broj stabilnijih radikala poput semikvina koji sa O_2 proizvodi O_2^- , hidroksil radikal (OH^*) i vodonik peroksid (H_2O_2). Ova faza takođe ima svojstvo helatora i može vezati gvožđe koje proizvodi tar-semikvinon + tar- Fe^{+2} koji onda permanentno generiše H_2O_2 . Tečnost koja oblaže respiratornu površinu, predstavlja

prvu liniju odbrane pluća od oksidanata i radikala iz duvanskog dima (MacNee 2000).

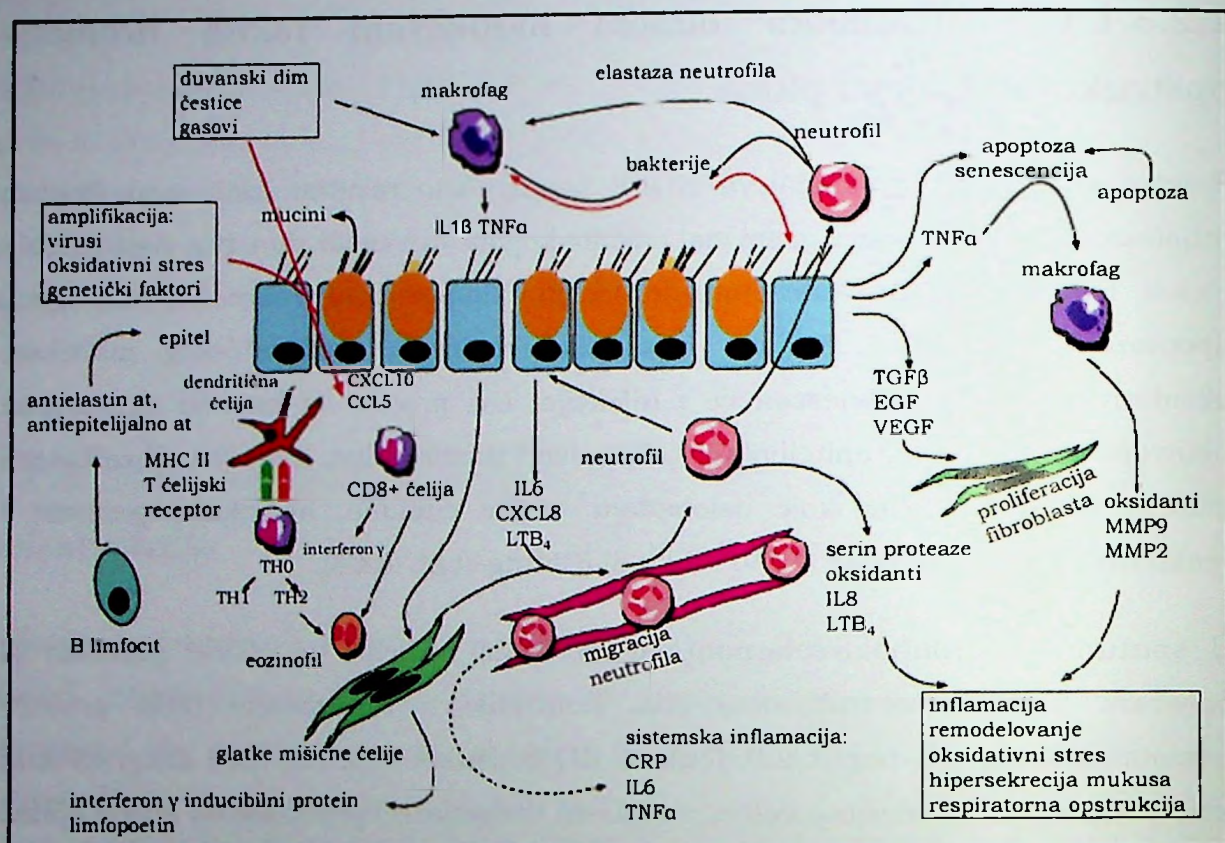
1.2.3.1.1. Duvanskim dimom indukovani razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća

Smatra se da većina slučajeva HOBP nastaje kao rezultat izloženosti štetnim inhalacionim česticama i gasovima, među kojima duvanski dim ima najizraženiji efekat. Izlaganje duvanskom dimu dovodi do inflamacije, alteracije ćelijskog rasta, apoptoze, abnormalne ćelijske reparacije, oštećenja međućelijskog matriksa, oksidativnog stresa, senescencije i infekcija. Ovi procesi su praćeni aktivacijom neutrofila, makrofaga, epitelijalnih ćelija, dendritičnih ćelija, limfocita, fibroblasta i glatkih mišićnih ćelija koje oslobađaju brojne citokine, hemokine, proteaze i reaktivne kiseonične vrste (RKV) (Slika 5) (Chung et al. 2008).

U sputumu i bronhoalveolarnom lavatu (BAL) obolelih od HOBP prisutan je povećani broj aktiviranih neutrofila. Neutrofile u respiratorni trakt privlače hemotaktički agensi poput interleukina (IL) 8, leukotriena (LT) B₄ i drugi citokini koje oslobađaju rezidentne ćelije, alveolarni makrofazi, epitelijalne ili endotelijalne ćelije. Neutrofilu su pretežno lokalizovani u bronhijalnom epitelu i žlezdama, ali i u glatkim mišićima. Duvanski dim smanjuje sposobnost fagocitoze netrofila i time povećava rizik od respiratornih infekcija kod pušača i obolelih. Smatra se da je neutrofilija u plućima povezana sa hipersekrecijom mukusa usled oslobađanja serin-proteaza koje stimulišu sekreciju mukusa submukoznih žlezda i peharastih ćelija epitela. Neutrofilu su glavni izvor elastaze i oksidanata u plućima. IL8 ostvaruje hemotaktički efekat prema eozinofilima. Broj eozinofila je povećan kod obolelih i smatra se da oni imaju ulogu pri pogoršanju bolesti (Slika 5) (MacNee 2000, Chung et al. 2008, Barnes et al. 2003).

Broj makrofaga u plućnom parenhimu, BAL i sputumu je kod obolelih od HOBP povećan 5 do 10 puta. Makrofazi oslobađaju RKV, leukotriene, prostaglandine, citokine, hemokine (CXCL) i MMP (eng. Matrix Metalloproteinase) pa stoga predstavljaju potentne efektore u HOBP. U malim disajnim putevima pušača mogu se naći klasteri makrofaga koji dovode do peribronhialne fibroze, što se može povezati sa fibrozom malih disajnih puteva i centrilobularnim emfizemom.

Duvanski dim indukuje proliferativne sposobnosti makrofaga i smanjuje sposobnost fagocitoze apoptotskih neutrofila (Slika 5) (Barnes et al. 2003, Chung et al. 2008).



Slika 5. Molekularni i celularni mehanizmi koji povezuju hronično dejstvo duvanskog dima i hroničnu inflamaciju kod HOBP. Preuzeto iz Chung et al. Eur Respir J. 2008;31(6):1334.

TNF α -eng. Tumor Necrosis Factor α ; IL-interleukin; EGF-eng. Epidermal Growth Factor; TGF β -eng. Transforming Growth Factor β ; VEGF-eng. Vascular Endothelial Growth Factor; MMP-eng. Matrix Metalloproteinase; LT-leukotrien; CRP-C reaktivni protein; CXCL-CXC hemokin ligand; CCL-CC hemokin ligand; TH-T Helper ćelija; MHC-eng. Major Histocompatibility Complex.

Dendritične ćelije imaju važnu ulogu u inicijaciji prirodnog i adaptivnog imuniteta. One mogu da aktiviraju druge ćelije imunog sistema uključujući makrofage, neutrofile, T limfocite i B limfocite. Smatra se da imaju važnu ulogu u plućnom odgovoru na duvanski dim i druge štetne agense. U alveolarnom zidu pušača je povećan broj dendritičnih ćelija. Histiocitoza, koja se isključivo javlja kod pušača i dovodi do destrukcije plućnog parenhima, je takođe izazvana dendritičnim ćelijama (Slika 5) (Barnes et al. 2003).

Hipotezu o autoimunom mehanizmu hronične inflamacije i emfizema potvrđuje prisustvo antitela na proteine oštećene hroničnim dejstvom duvanskog dima, poput

antielastin-antitela, antiepitelijalnog-antitela i antiidiotipskog-antitela duvana kod obolelih pušača. Ukupan broj T limfocita u plućnom parenhimu, perifernom i centralnom respiratornom traktu je povećan i pozitivno korelira sa oštećenjem alveola i težinom respiratorne opstrukcije, što je uglavnom karakteristika obolelih, a ne zdravih pušača. Postoji veza između broja apoptotskih ćelija i CD8⁺ ćelija u alveolarnom zidu, što može da se objasni njihovom ulogom u indukciji apoptoze kada postoji virusna infekcija. Broj CD4⁺ T limfocita je takođe povećan u malim disajnim putevima pušača sa teškom HOBP. Ove ćelije ekspimiraju hemokin CXCL10 koji kontroliše oslobađanje metaloproteinaza matriksa (Slika 5) (Barnes et al. 2003, Chung et al. 2008).

Epitelijalne ćelije aktivirane dejstvom duvanskog dima proizvode inflamatorne medijatore uključujući TNF α (eng. Tumor Necrosis Factor α), IL1 β , GM-CSF (eng. Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), EGF (eng. Epidermal Growth Factor), VEGF (eng. Vascular Endothelial Growth Factor), IL8, kao i RKV. One takođe, mogu biti izvor TGF β (eng. Transforming Growth Factor β) čija je ekspresija smanjena kod obolelih od HOBP. TGF β inhibira proliferaciju ćelija, dovodi do diferencijacije ćelija i produkcije komponenti međućelijskog matriksa, a njegova smanjena ekspresija može dovesti do oštećenja alveolarnih struktura. Peharaste ćelije proizvode mukus, koji štiti pluća od bakterija i štetnih čestica, a epitelijalne ćelije sekretuju defensine i druge katjonske peptide sa antimikrobijalnim učinkom. Pored uloge u prirodnom odbrambenom sistemu, uključene su i u proces reparacije tkiva, sekretuju antioksidante i antiproteinaze. Respiratorni epitel obolelih često pokazuje skvamozne metaplazije usled povećane proliferacije ćelija koja je primećena i kod zdravih pušača (Slika 5) (Barnes et al. 2003).

1.2.3.2. Aerozagađenje

Mnogobrojne štetne supstance, prisutne u zagađenom vazduhu, takođe ostvaruju štetan efekat i uzrokuju oksidativni stres u kontaktu sa plućima. Gasoviti zagađivači poput ozona (O₃), sumpor-dioksida (SO₂) i azot-dioksida (NO₂), i čestice uključujući ultrafine čestice i dizel-izduvne čestice dovode do pojave RKV kao što su O₂⁻, H₂O₂, OH[.]. Uticaj zagađenog vazduha se ogleda u reverzibilnom smanjenju funkcije pluća, inflamaciji, respiratornoj hiperreaktivnosti, modifikaciji imunskog odgovora, češćim egzacerbacijama, pa i smrtnom ishodu (Ciencewicksi et al. 2008).



Pokazano je da zagađenje koje potiče od izduvnih gasova ima kratkoročne i dugoročne efekte na hronične respiratorne bolesti, čak i u sredinama sa nižim nivoom aerozagađenja (Lindgren et al. 2009).

1.2.4. Uloga genetičkih faktora u razvoju hronične opstruktivne bolesti pluća

Premda pušenje predstavlja najznačajniji faktor rizika za razvoj HOBP, svega 10-20% teških hroničnih pušača razvije simptomatski HOBP (Fletcher et al. 1977). Blaži oblik bolesti koji se može javiti kod pušača, ukazuje na razliku u ispoljavanju fenotipa i odražava ulogu genetičkih faktora u razvoju bolesti (Rennard et al. 2006). Porodične studije i studije blizanaca su pokazale da postoji agregacija spirometrijskih vrednosti, što ukazuje na uticaj genetičkih faktora na varijacije u plućnoj funkciji (Redline et al. 1989, Lewitter et al. 1984). Takođe je uočen i veći stepen opstrukcije pluća kod članova porodice koji su u prvom stepenu srodstva sa obolelima od HOBP u odnosu na kontrolne ispitanike, čime se jasno potvrđuje uloga genetičkih faktora u ovoj bolesti (Cohen 1980, Kueppers et al. 1977).

Jedini, za sada dokazani genetički faktor rizika za razvoj HOBP je deficijencija α_1 AT.

U identifikaciji genetičkih faktora u kompleksnim bolestima, u koje spada i HOBP, primenjuju se dva pristupa. Jedan pristup predstavlja poziciono kloniranje i podrazumeva identifikaciju hromozomskih regiona koji segregiraju sa bolešću i mogu se identifikovati u porodičnim studijama. Drugi pristup podrazumeva ispitivanje gena kandidata, i identifikaciju genskih varijanti u genima od interesa u asocijativnim studijama (Cookson 2006).

Tehnikom pozicionog kloniranja ili analizom genomske vezanosti (eng. Genome-Wide Linkage Analysis) u Bostonskoj studiji HOBP, koja je uključila 72 porodice sa 585 članova, identifikovana je povezanost post-bronhodilatatornog FEV_1/FVC sa regionom hromozoma 2q, FEV_1 vrednosti sa regionom hromozoma 12p i blage opstrukcije pluća kod pušača sa regionom hromozoma 19 (Silverman¹ et al. 2002, Silverman² et al. 2002). Međutim, efikasnost ovog pristupa je umanjena time što se HOBP najčešće javlja u srednjem životnom dobu, pa većina članova porodice nije dostupna za analizu.

Primena metode za analizu diferencijalne ekspresije gena na čipu (microarray) omogućila je uvid u ekspresiju gena koja karakteriše obolele od HOBP i pušače. Ustanovljeno je da postoji promena u ekspresiji 203 gena u plućnom tkivu pušača obolelih od HOBP (Wang et al. 2008). U istraživanju na ćelijama respiratornog epitela, analizirana je ekspresija gena uključenih u odbranu od oksidativnog stresa, i utvrđeno je da postoji razlika u ekspresiji 341 gena između zdravih nepušača i pušača i 200 gena između obolelih od HOBP i zdravih pušača (Pierrou et al. 2007). Na osnovu razlika u ekspresiji gena, u zavisnosti od pušačkog statusa analiziranih subjekata, 28 gena je klasifikovano kao ireverzibilni, 6 gena kao sporo i 139 gena kao brzo reverzibilni geni, u smislu odgovora na dejstvo duvanskog dima (Beane et al. 2007). Geni koji su pokazali promenu ekspresije uglavnom učestvuju u imunskom odgovoru, signalnoj transdukciji, inflamaciji, apoptozi, remodelovanju međucelijskog matriksa i oksidativnom stresu.

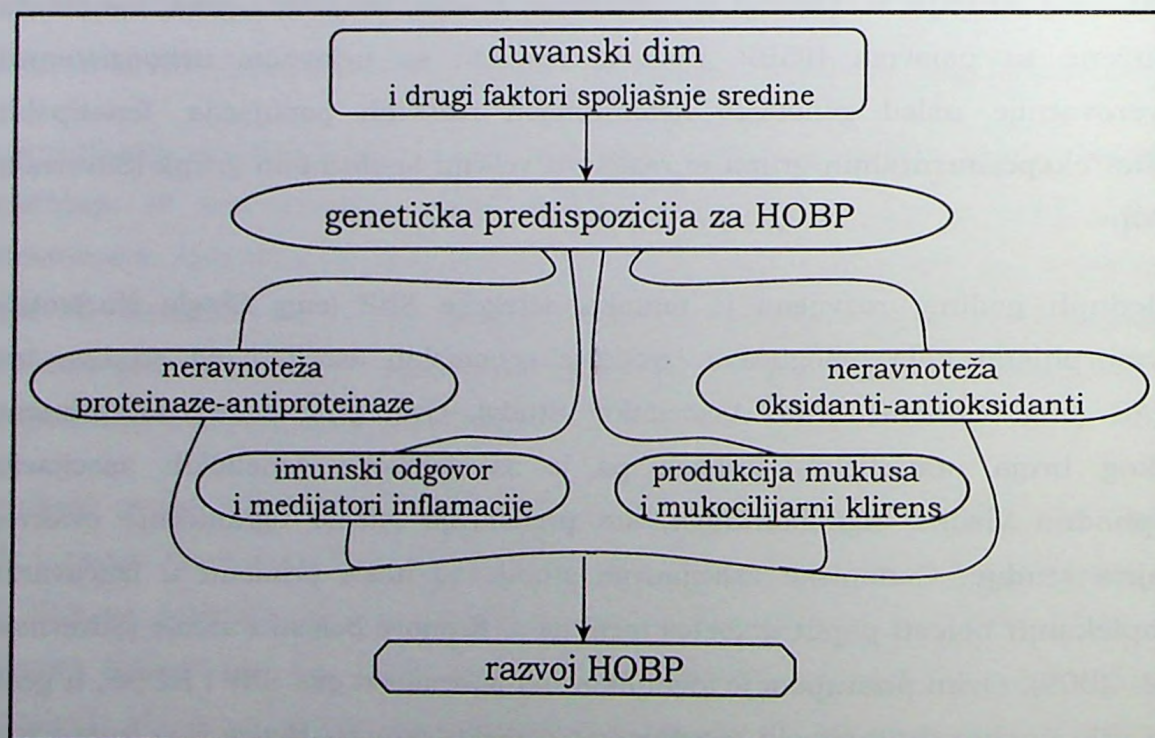
Asocijativne studije gena kandidata podrazumevaju pretraživanje genskih mutacija ili polimorfizama u genima za koje se smatra da mogu biti uključeni u patogenezu HOBP. Da bi se analizirala uloga određene genske varijante u bolesti, sprovode se studije koje obuhvataju grupu pacijenata i kontrolnu grupu. Do sada je objavljen veliki broj studija u kojima su određene genske varijante, gena kandidata, udružene sa pojavom HOBP. Dobijeni rezultati su uglavnom nekonzistentni, najverovatnije usled genetičke heterogenosti različitih populacija, fenotipskih razlika eksperimentalnih grupa ili razlika u veličini analiziranih grupa (Silverman 2006).

Poslednjih godina, razvijena je tehnika detekcije SNP (eng. Single Nucleotide Polymorphism) koja omogućava izvođenje genomskih asocijativnih studija, tzv. GWAS (eng. Genome Wide Association Study). Ovaj pristup zahteva primenu velikog broja statističkih testova, pa je za detekciju genetičkih asocijacija neophodna visoka signifikantnost, što predstavlja glavno ograničenje ovakvog dizajna studije. Genomske asocijativne studije su našle primenu u izučavanju kompleksnih bolesti poput diabetes mellitus-a, Kronove bolesti i astme (Silverman et al. 2009). Ovim pristupom je identifikovana povezanost dva SNP i HOBP, u genu za α nikotinski acetilholinski receptor kao i SNP u genu za Hedge Hog Interacting Protein (Boezen 2009).

Visoka stopa smrtnosti koja karakteriše HOBP, kao i njena hronična i progresivna priroda uticali su na intenzivna molekularno-genetička istraživanja sa ciljem

identifikacije faktora rizika za njen razvoj. Dosadašnja ispitivanja ukazuju da je HOBP složeno oboljenje u čiju je etiologiju uključen veliki broj genetičkih i sredinskih faktora i njihovih složenih interakcija, gen-gen i gen-sredinski faktor, kao i epigenetičkih modifikacija koje za posledicu imaju dodatnu kompleksnost u definisanju etiopatoloških uzročnika. Krajnji cilj ovih istraživanja je pronalaženje efikasnog terapijskog pristupa. Identifikacija genetičkih faktora rizika može biti značajna za ranu identifikaciju osoba koje nose rizik za razvoj plućnih bolesti usled dejstva štetnih faktora spoljašnje sredine, kao i u kliničkoj praksi u prevenciji težih oblika bolesti.

Uloga genetičkih faktora u patogenezi HOBP je potvrđena različitim pristupima i na osnovu dosadašnjih saznanja predložen je model koji obuhvata grupe gene odgovorne za procese ravnoteže proteinaze-antiproteinaze, ravnoteže oksidanti-antioksidanti, imunskog odgovora, inflamacije, produkcije mukusa i mukocilijarnog klirensa. Obzirom da HOBP karakteriše promenjena ekspresija gene odgovornih za pomenute procese, prisustvo funkcionalnih genskih varijanti u njima može imati važnu ulogu u razvoju bolesti i predstavlja oblast intenzivnog istraživanja (Slika 6).



Slika 6. Model patogeneze HOBP. Sampsonas et al. Curr Med Chem. 2006;13(24):2857.

1.2.4.1. Proteinaze i antiproteinaze

Jedna od teorija patogeneze HOBP pretpostavlja postojanje neravnoteže proteinaze-antiproteinaze. Smatra se da razgradnja vezivnih komponenti pluća, naročito elastina, različitim proteinazama predstavlja ključni mehanizam u nastanku emfizema kod pušača. Ovim konceptom se može objasniti nastanak bolesti kod α_1 AT deficijentnih osoba. Poznato je da dejstvo duvanskog dima dovodi do smanjene aktivnosti α_1 AT što usled smanjene inhibicije elastaze doprinosi neravnoteži odnosa proteinaze-antiproteinaze. Antiproteinaze štite pluća od proteinazne aktivnosti, a emfizem se javlja kao posledica povećanja aktivnosti proteinaza ili smanjenja aktivnosti antiproteinaza. Najveći broj dosadašnjih istraživanja je obuhvatio serin-proteinaze, elastazu neutrofila, proteinazu 3 i familiju katepsina za koje je ustanovljeno da imaju ulogu u nastanku emfizema na životinjskim eksperimentalnim modelima. Takođe postoje brojni dokazi o ulozi MMP u razvoju HOBP kod pušača (Belvisi et al. 2003, Barnes et al. 2003).

1.2.4.1.1. α_1 Antitripsin

α_1 AT pripada superfamiliji proteinaznih inhibitora koju uglavnom čine inhibitori serin-proteaza, i označava se kao SERPIN (eng. Serine Protease Inhibitors) A1. Gen za α_1 AT nalazi se na hromozomu 14q32.1. α_1 AT se sintetiše u jetri, ali i u alveolarnim makrofazima i monocitima i predstavlja glavni inhibitor elastaze neutrofila u plućima. Ovo je izrazito polimorfan protein i do sada je opisano više od 90 fenotipski različitih varijanti α_1 AT (Tzortzaki et al. 2006). Najčešće alelske varijante su označene kao PI M, S i Z, pri čemu PI M1, M2, M3 i M4 predstavljaju normalne varijante, dok S i Z aleli redukuju nivo α_1 AT u serumu u odnosu na nosioce PI M varijante.

Mutirana PI Z alelska varijanta nastaje usled amino-kiselinske zamene Glu342Lys u proteinu, što narušava nativnu konformaciju proteina i dovodi do njegove akumulacije u endoplazmatičnom retikulumu hepatocita. Nefunkcionalni protein formira polimere u inkluzionim telima hepatocita i može uzrokovati različita oboljenja jetre (Lomas 2007). Usled toga je nivo α_1 AT u serumu snižen, a time i smanjena inhibicija elastaze, što dovodi do povećanog proteolitičkog stresa u plućima. Protein Z formira nefunkcionalne polimere i u plućima, i time dodatno

oštećuje plućno tkivo, a polimeri imaju hemotaktička svojstva i doprinose inflamaciji u plućnom tkivu (Lomas 2007). Nosioци genotipa PI ZZ imaju tešku deficijenciju α_1 AT, a koncentracija α_1 AT u serumu iznosi svega 16%, dok nosioци PI MZ imaju u proseku 83% od normalne vrednosti (Tzortzaki et al. 2006). Pacijenti sa teškom deficijencijom α_1 AT imaju izražen pad FEV₁ vrednosti čak i ukoliko nisu pušači. Kod pušača sa PI ZZ genotipom emfizem se razvija u ranijem životnom dobu (Sandford et al. 1997). Mada deficijencija α_1 AT predstavlja značajan faktor rizika za nastanak HOBP, na ovaj način se može objasniti svega 1-2% slučajeva. Heterozigotni nosioци alela Z su češće zastupljeni, ali rezultati istraživanja u pogledu faktora rizika za nastanak HOBP kod tih subjekata još uvek nisu potpuno razjašnjeni. U studijama u kojima su poređeni nepušači, nosioци PI MZ i MM genotipova, nije usanovljena značajna razlika u plućnoj funkciji ili simptomima. Međutim, pokazano je da pušače genotipa PI MZ karakteriše gubitak elastičnosti pluća i pad FEV₁ vrednosti u poređenju sa nepušačima PI MM genotipa (Sandford et al. 1997).

Mutacija u egzonu 3, α_1 AT gena dovodi do zamene Glu264Val i označena je kao alel PI S. Nosioци genotipova PI MS i PI SS imaju blagu deficijenciju α_1 AT, 97% odnosno 93% koja ne dovodi do razvoja HOBP (Tzortzaki et al. 2006). U slučaju složenog heterozigota, genotip PI SZ, nivo α_1 AT u serumu iznosi 51% što dovodi do blaže opstrukcije pluća u poređenju sa PI ZZ.

Pored navedenih, postoje i druge genske varijante koje dovode do smanjenog nivoa α_1 AT, kao što su: PI I, M_{Malton}, M_{Pittsburgh} kao i delecije gena za α_1 AT, ali su one daleko manje zastupljene (Yang et al. 2008).

Osobe sa teškom deficijencijom α_1 AT imaju značajan rizik za pojavu emfizema u ranijoj životnoj dobi, naročito ukoliko puše. Međutim fenotipska ekspresija bolesti jetre i pluća, u slučaju deficijencije α_1 AT, može značajno da varira usled uticaja drugih gena modulatora i faktora spoljašnje sredine.

1.2.4.1.2. Metaloproteinaze matriksa

Metaloproteinaze matriksa čine familiju 20-ak strukturno i funkcionalno srodnih Zn²⁺-zavisnih endopeptidaza koje su zajedno sposobne da razgrade sve komponente ekstracelularnog matriksa. Geni za MMP su smešteni na hromozomima 11, 14, 16,

20 i 22. Svi članovi familije sadrže propeptidni domen, katalitički domen i C-terminalni domen, osim metaloproteinaze matrilizin (MMP7) (Belvisi et al. 2003, Chakraborti et al. 2003, Parks et al. 2001).

Kontrola aktivnosti MMP vrši se na transkripcionom, translacionom i sekrecionom nivou, kao i pomoću aktivatora i inhibitora (Belvisi et al. 2003). U regulaciji na transkripcionom nivou uključeni su EGR (eng. Early Growth Response Protein) 1, NFκB (eng. Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells), GATA (eng. Globin Transcription Factor) 1, AP (eng. Activator Protein) 1, STAT (eng. Signal Transducer and Activator of Transcription) 3C, TGFβ, IL1, IL6, TNFα (Greenlee et al. 2007). Poznato je da RKV, poput O_2^- , OH^- i H_2O_2 , aktiviraju AP1 i ETS (eng. E-Twenty Six) transkripcione faktore i pored reaktivnih azotnih vrsta (RAV) utiču na ekspresiju MMP. Duvanski dim, aerozagadenje kao i bakterijske infekcije takođe utiču na ekspresiju proteinaza (Greenlee et al. 2007). Sekrecija MMP vrši se u obliku pro-MMP, a aktivacija podrazumeva uklanjanje propeptida enzimski ili narušavanje interakcije Zn^{+2} -Cys u katalitičkom domenu. Većina MMP se eksportuje do površine ćelije gde se usidri ili sekretuje. Izuzetak su MMP8 i MMP9 koje se pakuju u specifične granule neutrofila odnosno makrofaga (MMP12) (Belvisi et al. 2003). Njihova aktivnost je regulisana inhibitorima TIMP (eng. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) 1, 2, 3 i 4. Oni se uglavnom koeksprimiraju sa MMP i vezani su za njih u odnosu 1:1 (Belvisi et al. 2003). Mnoge MMP su u normalnom zdravom tkivu eksprimirane na veoma niskom nivou ili nisu uopšte eksprimirane, za razliku od tkiva koje se reparira i remodeluje, u patološkim stanjima ili pri inflamaciji. Smatra se da MMP mogu biti uključene u razvoj malignih i inflamatornih bolesti (Parks et al. 2001). Glavni izvori MMP u plućima su makrofazi i neutrofili, ali se one takođe sintetišu u alveolarnim i epitelijalnim ćelijama, fibroblastima i dendritičnim ćelijama.

1.2.4.1.2.1. Metaloproteinaza matriksa 1, 9 i 12

Pokazano je da plućno tkivo i indukovani sputum pacijenata sa HOBP karakteriše povećan nivo MMP1 (kolagenaza 1), MMP2 (želatinaza A), MMP8 (kolagenaza 2) i MMP9 (želatinaza B) (Segura-Valdez et al. 2000). Uočena je negativna korelacija između aktivnosti MMP1, MMP8 i MMP9 iz sputuma i FEV₁ vrednosti. (Culpitt et al. 2005). Alveolarni makrofazi izolovani iz BAL pacijenata sa HOBP imaju povećani

nivo ekspresije mRNA MMP1 i MMP9 u poređenju sa zdravim pušačima i nepušačima, za razliku od pneumocita tipa II kod kojih je prisustvo mRNA i proteina MMP1 detektovano samo kod obolelih, a ne i u slučaju pušača i kontrola (Imai et al. 2001, Finlay et al. 1997).

Nekoliko studija sprovedenih na miševima potvrdilo je ulogu MMP u respiratornoj inflamaciji i nastanku emfizema. Kod transgenih miševa kod kojih je MMP1 overekspimirana, dolazi do morfoloških promena veoma sličnih humanom emfizemu (D'Armiento et al. 1992). MMP9 knock-out miševi nisu zaštićeni od pojave emfizema usled dejstva duvanskog dima, ali jesu od fibroze malih disajnih puteva (Lanone et al. 2002). Miševi kod kojih je gen za MMP12 deletiran ne razvijaju emfizem i pored izloženosti duvanskom dimu, što ukazuje na ključnu ulogu MMP12 u indukciji oštećenja pluća duvanskim dimom (Hautamaki et al. 1997).

Genske varijante u okviru gena za MMP koje utiču na ekspresiju ovih gena mogu biti odgovorne za neravnotežu protinaze-antiproteinaze i predmet su velikog broja istraživanja. U promotorskom regionu gena za MMP1 opisana je varijanta G-1607GG, gde insercija jednog guanina formira vezujuće mesto za transkripcioni faktor ETS. Ustanovljeno je da alel -1607GG ima veću transkripcionu aktivnost, što može dovesti do veće razgradnje matriksa (Rutter et al. 1998). Intersticijalna kolagenaza 1 je uključena u razgradnju fibrilarnog kolagena, tako što seče kolagen tipa I, II i III na $\frac{3}{4}$ i $\frac{1}{4}$ fragmente. Opisana je uloga genske varijante G-1607GG u različitim tipovima karcinoma, kao i overekspresija MMP1 u invaziji tumorskih ćelija i metastazama (Ye 2000). U studiji Joos-a i saradnika ustanovljena je negativna korelacija sa smanjenjem plućne funkcije kod nosioca jednog ili oba alela -1607GG.

U promotoru gena za MMP9 opisana je genska varijanta C-1562T koja ukida vezivno mesto nepoznatog represora što za posledicu ima povećanu promotorsku aktivnost gena (Zhang et al. 1999). MMP9 degraduje kolagen tipa IV, glavnu strukturnu komponentu bazalne membrane, kao i elastin. Stoga zajedno sa intersticijalnom kolagenazom može imati značajan efekat na glavne ekstracelularne komponente matriksa, tj. razgradnju fibrilarnog kolagena i elastina, što vodi oštećenju alveolarnog zida i migraciji inflamatornih ćelija kroz bazalnu membranu. Pokazano je da genska varijanta C-1562T ima značajno veću učestalost kod pacijenata sa emfizemom i HOBP u odnosu na kontrolne subjekte, kao i da je alel

-1562T udružen sa emfizemom koji dominira u gornjem delu pluća (Minematsu et al. 2001, Tesfaigzi et al. 2006, Ito et al. 2005).

MMP12 je metaloelastaza makrofaga, koja pored elastina uspešno razgrađuje i komponente bazalne membrane među kojima i kolagen tipa IV. U promotorskom regionu identifikovana je genska varijanta A-82G, pri čemu ja za alel -82A ustanovljeno da poseduje veći afinitet za vezivanje faktora AP1, pa samim tim i veću promotorsku aktivnost. Ustanovljena je udruženost alela -82A sa proširenjem koronarnih arterija kod obolelih od koronarnih bolesti i dijabetesa (Jormsjö et al. 2000).

1.2.4.1.3. Drugi geni povezani sa neravnotežom proteinaze-antiproteinaze

Pored već pomenutih, pokazano je da i drugi geni mogu biti uključeni u neravnotežu proteinaze-antiproteinaze. Dve genske varijante u okviru gena za TIMP2 su povezane sa HOBP u japanskoj i egipatskoj populaciji (Sampsonas et al. 2006). Gen SERPINE2, čija je udruženost sa FEV₁/FVC vrednošću mapirana u Bostonskoj studiji, poseduje nekoliko genskih varijanti koje koincidiraju sa pojavom HOBP (Zhu et al. 2007). U genu za α_2 makroglobulin opisana je delecija 5 baznih parova koja povećava faktor rizika za nastanak HOBP 20 do 30 puta. Pored toga geni za ADAM (eng. A Disintegrin and Metalloprotease) 33 i SERPINA3 (α_1 antihimotripsin) bi takođe mogli imati ulogu u patologiji respiratornih bolesti (Sampsonas et al. 2006, Tzortzaki et al. 2006).

1.2.4.2. Oksidanti i antioksidanti

Oksidativni stres predstavlja jednu od najmarkantnijih karakteristika HOBP. Slobodni radikali mogu biti egzogenog porekla, kao što je duvanski dim, zagađen vazduh ili ozon, i endogenog porekla, kada ih proizvode inflamatorne ćelije u plućima poput neutrofila i makrofaga. Ravnoteža između toksičnosti oksidanata i antioksidativnog odbrambenog sistema je kritična za održavanje normalne funkcije u ćelijama pluća. Pomeranje ravnoteže oksidanti-antioksidanti u smeru oksidanata

predstavlja oksidativni stres (MacNee 2005). Postoje brojni dokazi o povećanom oksidativnom stresu kod pušača i obolelih od HOBP (MacNee 2001).

Slobodni radikali dovode do direktnog oštećenja proteina, lipida i DNK. Nezasićene masne kiseline u sastavu ćelijske membrane su jedno od glavnih mesta napada slobodnih radikala. U lančanoj reakciji dolazi do peroksidacije lipida, a ukoliko se reakcija ne zaustavi nastupa trajno oštećenje ćelijske membrane i ćelijska smrt. Produkti peroksidacije lipida poseduju hemotaktička svojstva prema neutrofilima, aktiviraju ćelijsku proliferaciju, inhibiciju, apoptozu, brojne signalne puteve i indukuju ekspresiju proinflammatoryh gena (Rahman et al. 2006). Ustanovljeno je da nivo produkata peroksidacije lipida korelira sa stepenom ograničenja protoka vazduha u plućima (MacNee 2005).

Slobodni radikali aktiviraju NF κ B što dovodi do otključavanja inflamatornih gena i amplifikacije inflamatornog odgovora. Oksidativni stres aktivira HAT (eng. Histone Acetyltransferase) koja takođe otključava brojne proinflammatoryh gene. Aktivacija AP1 uključuje, kao i u slučaju NF κ B, nekoliko redoks-senzitivnih koraka. AP1 i NF κ B u makrofazima indukuju inflamaciju neutrofilima tako što povećavaju ekspresiju IL8, CXC, TNF α i MMP9 (Barnes et al. 2003).

Najvažniji antioksidanti u tečnosti koja oblaže pluća su mucini, redukovani glutation (GSH), urea, albumin i askorbinska kiselina (MacNee 2005).

Neutralizacija štetnih supstanci obavlja se putem metabolizma ksenobiotika koji uključuje sistem enzima faze I i II. Fazu I, bioaktivacije, katalizuju dve grupe monooksigenaza CYP (eng. Cytochrome) P-450 zavisne monooksigenaze i flavin monooksigenaze (FMN). U fazu II, detoksifikacije, su uključene glutation-S-transferaze (GST), sulfotransferaze, glukuronil-transferaze i mEPHX (eng. Microsomal Epoxide Hydrolase) (Castell et al. 2005). Tokom faze I, mnoge toksične supstance se prevode u vrlo reaktivne intermedijere koji mogu da oštete ćeliju, da bi tokom faze II postigli hidrosolubilnost čime se omogućava njihova eliminacija iz organizma. Genske varijante u genima koji su uključeni u ksenobiotički metabolizam i odbranu od oksidativnog stresa, predstavljaju genetičke faktore rizika za nastanak HOBP.

1.2.4.2.1. Citohrom P-450

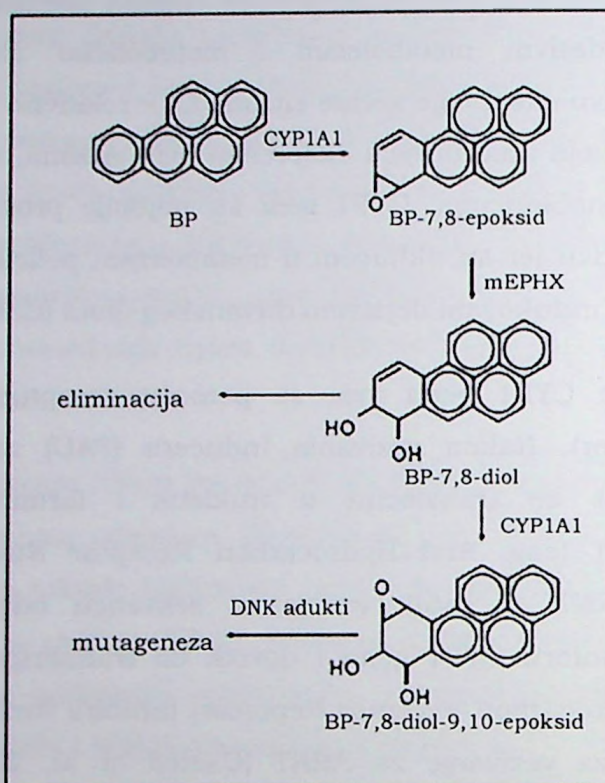
CYP P-450 predstavlja superfamiliju hemoproteina uključenih u fazu I ksenobiotičkog metabolizma. Ova superfamilija enzima predstavlja glavni sistem koji katalizuje oksidativni metabolizam i metaboličku aktivaciju toksičnih supstanci. Mada je nivo ekspresije većine enzima CYP relativno nizak u plućima, u poređenju sa jetrom koja ima najveću ekspresiju ovih enzima, većina CYP gena se može indukovati ksenobioticima. CYP1 geni su najbolje proučeni od svih P450 enzima u plućnom tkivu jer su uključeni u metabolizam policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAU) i indukovani dejstvom duvanskog dima (Castell et al. 2005).

Regulacija ekspresije CYP1 gena vrši se pomoću receptora AHR (eng. Aryl Hydrocarbon Receptor). Nakon vezivanja inducera (PAU) za receptor AHR u citoplazmi, kompleks se translocira u nukleus i formira heterodimer sa translokatorom ARNT (eng. Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). Heterodimer AHR-ARNT se zatim vezuje za sekvencu odgovornu za dejstvo ksenobiotika u promotoru CYP1 gena i dovodi do transkripcije gena. Represor AHRR (eng. Aryl Hydrocarbon Receptor Represor) inhibira funkciju AHR, tako što kompetira sa AHR za vezivanje za ARNT (Castell et al. 2005). Funkcionalne promene u CYP genima koje utiču na kinetiku reakcija ksenobiotičkog metabolizma mogu imati za posledicu povećanu toksičnost usled neravnoteže između reakcija aktivacije i detoksifikacije.

1.2.4.2.1.1. Citohrom 1A1 i 2E1

CYP1A1 je uključen u metabolizam prokancerogena iz duvanskog dima kao što su PAU i aromatični amini. Gen za CYP1A1 se nalazi na hromozomu 15q22-24. Ekspirira se u bronhijalnom epitelu i alveolarnim ćelijama. Smatra se da je CYP1A1 predominantno ekspimiran kod pušača. Uključen je u faze I ksenobiotičkog metabolizma, tokom koje mogu nastati veoma reaktivni elektrofilni intermedijeri. Jedan od njih je benzo(a)piren (BP) koji nastaje nepotpunim sagorevanjem dizel-izduvnih gasova a nalazi se i u duvanskom dimu (Slika 7) (Castell et al. 2005). CYP1A1 prevodi BP u BP-7,8-epoksid koji dalje predstavlja supstrat za mikrozomalnu hidrolazu epoksida koja ga prevodi u BP-7,8-diol. Ovaj

intermedijer može opet biti obrađen enzimom CYP1A1, pri čemu nastaje BP-7,8-diol-9,10-epoksid izrazito reaktivan intermedijer koji se kovalentno vezuje za DNK.



Slika 7. Uloga CYP1A1 u bioaktivaciji prokancerogena benzo(a)pirena. Preuzeto iz Castell et al. *Exp Toxicol Pathol.* 2005;57(Suppl 1)189.

CYP-eng. Cytochrome; mEPHX-eng. Microsomal Epoxide Hydrolase; BP-benzo(a)piren.

U genu CYP1A1 opisano je nekoliko genskih varijanti a jedna od najpoznatijih je T3801C (*MspI*) koja se nalazi u 3' flanking regionu gena. Za alel CYP1A1 *2A (3801C) je ustanovljeno da povećava mikrozomalnu aktivnost enzima dva puta (Landi et al. 1994). Enzim CYP1A1 je uključen u aktivaciju prokancerogena, i stoga je analizirana uloga genske varijante *MspI* u razvoju karcinoma. Utvrđena je povezanost ove varijante sa plućnim karcinomom u japanskoj, ali ne i u populaciji belaca (Hukkanen et al. 2002).

CYP2E1 je pored etanola uključen u aktivaciju nitrozamina iz duvanskog dima, kao i u oksidaciju industrijskih alkena i halogenih ugljovodonika (Thier et al. 2003, Hukkanen et al. 2002). Gen za CYP2E1 smešten je na hromozomu 10q24.3. Eksprimira se u bronhijalnim i alveolarnim epitelijalnim ćelijama i makrofazima, a smešten je u mikrozosomima. U promotorskom regionu ovog gena opisana je genska varijanta G-1293C (CYP2E1 *5B), koji dovodi do 10 puta povećane transkripcije i

enzimske aktivnosti (Daly 2003). Objavljeni podaci o njenoj ulozi u nastanku HOBP su kontradiktorni (Korytina et al. 2005, Gaspar et al. 2004, Arif et al. 2007).

1.2.4.2.2. Glutation-S-transferaze

Glutation-S-transferaze čine superfamiliju enzima koja je uključena u fazu II ksenobiotičkog metabolizma. One katalizuju konjugaciju redukovanog glutaciona sa različitim elektrofilnim jedinjenjima, omogućavaju njihovu ekskreciju i veoma su važne u detoksifikaciji supstanci iz duvanskog dima. Svrstavaju se u sedam klasa: α (GSTA), μ (GSTM), π (GSTP), σ (GSTS), θ (GSTT), ω (GSTO) i ζ (GSTZ) (Bolt et al. 2006).

1.2.4.2.2.1. Glutation-S-transferaza M1, T1 i P1

GSTM1 ima ulogu u detoksifikaciji različitih PAU epoksida koji nastaju kao produkti aktivnosti CYP enzima. Gen za GSTM1 je smešten u klasteru na hromozomu 1p13.3.

GSTT1 je uglavnom uključen u metabolizam metil-halogenida, kao što su reaktivni intermedijer vinil-hlorida i hlor-etilen-oksid. Gen za GSTT1 je smešten u klasteru na hromozomu 22p11.2.

U genima za GSTM1 i GSTT1 opisane su genske varijante koje dovode do delecija ovih gena i potpunog odsustva enzima kod homozigotnih nosioca. Učestalost ovih varijanti u opštoj populaciji iznosi oko 50% za GSTM1 -/- i oko 20% za GSTT1 -/- genotipove (Bolt et al. 2006). Pokazano je da postoji udruženost GSTM1 -/- genotipa sa emfizemom kod pacijenata sa plućnim karcinomom i teškim hroničnim bronhitisom kod pušača (Tzortzaki et al. 2006). Osim toga, potvrđena je uloga ovog genotipa u razvoju HOBP, kao i u razvoju teške HOBP ($FEV_1 < 35\%$ pred) kod pušača (Cheng et al. 2004). Takođe je ustanovljeno da GSTT1 -/- genotip sam za sebe, ili u kombinaciji sa GSTM1 -/- genotipom dovodi do progresivnog pada FEV_1 kod muškaraca ali ne i kod žena (Imboden et al. 2007).

Gen za GSTP1 se nalazi na hromozomu 11q13. GSTP1 je predominantno eksprimiran u plućima i uključen je u metabolizam diol-epoksida. Uočeno je da je

overeksprimiran u različitim tumorima. U okviru ovoga gena opisana je bazna zamena A313G koja dovodi do zamene Ile105Val u okviru hidrofobnog mesta odgovornog za supstratnu specifičnost što se manifestuje favorizovanjem određenog tipa reakcije. Pored toga što je utvrđeno da 105Ilelle predstavlja samostalan faktor rizika za nastanak HOBP, smatra se da u kombinaciji sa genskim varijantama drugih gena takođe može uticati na pojavu bolesti. Tako je ustanovljeno da je GSTM1 -/-, GSTT1 -/- i GSTP1 105Ilelle složeni genotip povezan sa progresivnim padom plućne funkcije (He et al. 2002).

1.2.4.2.3. Mikrozomalna hidrolaza epoksida

Mikrozomalna hidrolaza epoksida katalizuje prevođenje reaktivnih intermedijera epoksida u hidrofilne diole i uključena je u metabolizam benzena, benzo-a-pirena i drugih kancerogena poreklom iz duvanskog dima (Slika 7). Gen za mEPHX nalazi se na hromozomu 1q42.1. Ekspirira se u jetri i bronhijalnom epitelu. U kodirajućem regionu gena detektovane su dve genske varijante koje se relativno često javljaju u opštoj populaciji. Jedna dovodi do zamene Tyr113His i smanjenja enzimske aktivnosti za 40%, a označava se kao S (slow) alel. Druga uvodi His139Arg zamenu u proteinu i dovodi do povećane enzimske aktivnosti za 25%, a označava se kao F (fast) alel (Hassett et al. 1994).

Ustanovljeno je da pušači sa HOBP, nosioci S/S genotipa, imaju veći faktor rizika za nastanak teškog oblika ove bolesti ($FEV_1 < 35\%$ pred) (Cheng et al. 2004). Ovaj genotip takođe predstavlja faktor rizika za razvoj emfizema i HOBP (Wood et al. 2006).

Polimorfne varijante mEPHX u kombinaciji sa funkcionalnim genskim alelima gena koji su takođe uključeni u metabolizam ksenobiotika mogu predstavljati značajne faktore rizika za HOBP. Naime, prisustvo barem jednog alela S mEPHX, u kombinaciji sa genotipovima GSTM1 -/- i GSTP1 105Ilelle, 7 puta povećava rizik za pojavu bolesti kod pušača. Značajna izloženost duvanskom dimu osoba koje su nosioci složenog genotipa poput ovog sačinjenog od tri predisponirajuća alela može dovesti do težeg oštećenja i inflamacije plućnog parenhima (Cheng et al. 2004).

1.2.4.2.4. Drugi geni povezani sa neravnotežom oksidanti-antioksidanti

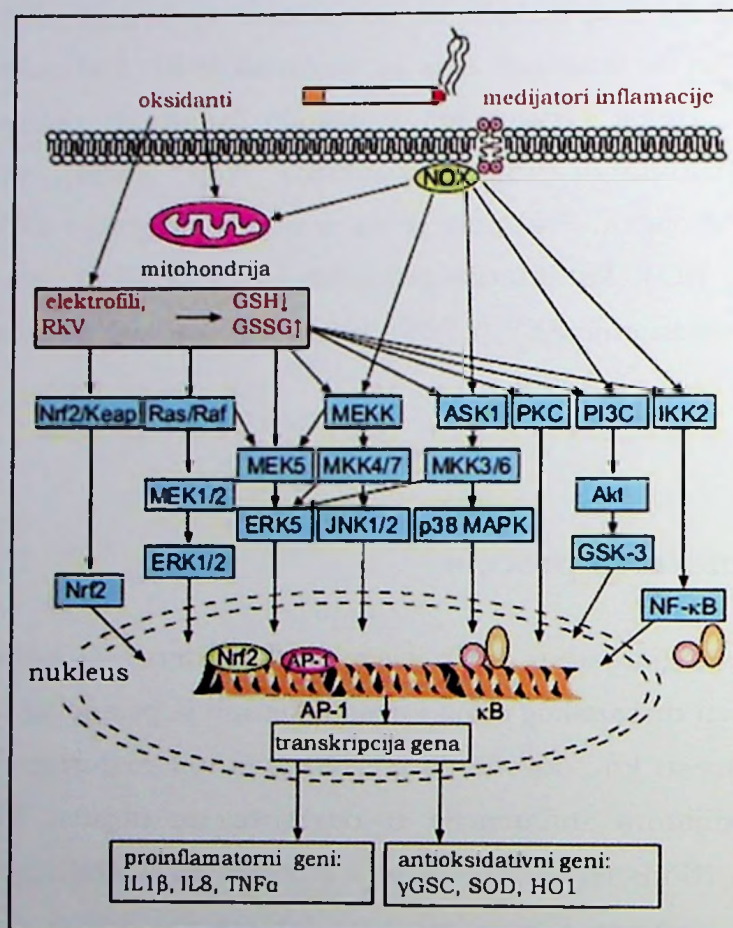
Pored pomenutih, i drugi geni poseduju funkcionalne varijante koje mogu uticati na balans oksidanata i antioksidanata. Superoksid dismutaza (SOD) 3 katalizuje prevođenje superoksid anjona u vodonik-peroksid i ima protektivnu ulogu u plućima naročito tokom inflamacije. Ustanovljeno je da se varijanta Arg213Gly značajno češće javlja kod pušača sa normalnom funkcijom pluća u odnosu na pacijente sa HOBP i da smanjuje rizik za nastanak HOBP kod pušača (Young et al. 2006). HO (eng. Heme Oxygenase) 1 takođe katalizuje razgradnju hema uz oslobađanje bilirubina i ugljen-monoksida koji imaju antioksidativna i antiinflamatorna svojstva. Pokazano je da nosioce većeg broja (GT) dinukleotida u okviru promotora HO1, karakteriše prisustvo promena sličnih emfizemu, uočenih skenerom, kao i smanjenje FEV₁ i FEV₁/FVC vrednosti kod pušača (Sampsonas et al. 2006, Guénéguou et al. 2006).

1.2.4.3. Inflamatorni procesi

Inflamacija predstavlja jednu od najvažnijih karakteristika patogeneze HOBP i pripisuje se dejstvu duvanskog dima i drugih štetnih supstanci iz spoljašne sredine i oksidativnom stresu koji dovode do regrutovanja inflamatornih ćelija u plućima. Oslobađanje medijatora inflamacije u odgovoru na dejstvo RKV ili TNF α je regulisano AP1 i NF κ B transkripcionim faktorima. RKV aktiviraju brojne protein kinaze, signalne proteine i transkripcione faktore što dovodi do remodelovanja hromatina i ekspresije proinflamatornih gena kao što su IL1 β , IL8 i TNF α i gena uključenih u odbranu od oksidativnog stresa poput γ glutamil-cistein sintetaze (γ GSC), SOD i HO1 (Slika 8). Odnos redukovanog (GSH) i oksidovanog (GSSG) glutationa direktno odslikava redoks stanje u ćeliji i važan je za aktivaciju redoks senzitivnih transkripcionih faktora (Rahman 2003).

Kod hronične inflamacije povećana je ekspresija proinflamatornih gena usled smanjene aktivnosti HDA (eng. Histone Deacetylase), koja se javlja zbog nitracije enzima u uslovima povećanog oksidativnog stresa (Rahman et al. 2006). Kod obolelih od HOBP je takođe prisutno značajno smanjenje ili odsustvo antiinflamatornog dejstva glukokortikoida. Oksidativni stres sprečava translokaciju

glukokortikoidnog receptora iz citoplazme u nukleus i njegovo vezivanje za DNK. Kortikosteroidi gase inflamatorne gene tako što regrutuju HDA do mesta transkripcije i usled deacetilacije histona dovode do gašenja inflamatornih gena i inflamacije. Kod pušača i obolelih, prisutno je znatno smanjenje aktivnosti HDA u makrofazima i plućnim ćelijama, čime je učinak kortikosteroida dodatno smanjen (Barnes et al. 2003, Chung et al. 2008).



Slika 8. Uloga oksidanata i medijatora inflamacije u aktivaciji protein kinaza i transkripcionih faktora koji dovode do transkripcije proinflamatornih i antioksidativnih gena. Preuzeto iz Chung et al. Eur Respir J. 2008;31(6):1334.

RKV-reaktivna kiseonična vrsta; GSH-redukovani glutation; GSSG-oksidovani glutation; NRF2-eng. Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor; REE-eng. Redox Factor; KEAP-eng. Kelch Like Erythroid Cell Derived Protein with CNC Homology Associated Protein; MAP-eng. Mitogen Activated Protein; MEK-eng. MAP Kinase Kinase; ERK-eng. Extracellular Signal Regulated Kinase; MEKK-eng. MAP/ERK Kinase Kinase; MKK-eng. MAP Kinase Kinase; JNK-eng. c Jun N Terminal Kinase; ASK-eng. Apoptosis Signal Regulating Kinase; MAPK-eng. MAP Kinase; PKC-protein kinaza C; PI3C-eng. Phosphatidylinositol 3 Kinase; AKT-eng. Akt Kinase; GSK-eng. Glycogen Synthase Kinase; IKK-eng. Inhibitor of NFκB Kinase; AP-eng. Activator Protein; IL-interleukin; TNFα-eng. Tumour Necrosis Factor α; γGCS-γ glutamil-cistein sintetaza; SOD-superoksid dismutaza; HO-eng. Heme Oxygenase.

Inflamacija koja karakteriše HOBP, takođe postoji i u plućima pušača, ali u znatno manjem obimu, što navodi na zaključak da kod obolelih postoji dodatna

amplifikacija normalne inflamacije izazvane različitim toksičnim supstancama. Neki od mehanizama koji mogu dovesti do amplifikacije uključuju latentnu adenovirusnu infekciju, smanjenu aktivnost HDA, ili prisustvo promene u genima uključenim u antiinflamatorne i antiproteazne procese (Barnes et al. 2003). Mada je pušenje glavni pokretač mehanizama koji dovode do bolesti, prestanak pušenja ne dovodi do smanjenja inflamatornog odgovora u plućima, naročito u slučajevima težih oblika bolesti.

1.2.4.3.1. Faktor nekroze tumora α

Faktor nekroze tumora α je multifunkcionalni proinflamatorni citokin koji uglavnom produkuje makrofazi u odgovoru na oštećenje ili inflamaciju. On je uključen u regulaciju ekspresije različitih gena i ima istaknutu ulogu u patogenezi HOBP. Nivo TNF α u indukovanom sputumu, BAL i biopsiji bronhijalnog tkiva je povišen kod obolelih od HOBP, pa se pretpostavlja da osobe sa povećanom produkcijom TNF α imaju veći rizik za nastanak ove bolesti (Sun et al. 1998). Gen za TNF α smešten je na hromozomu 6p21.3 u okviru glavnog kompleksa histokompatibilnosti, jednog od najpolimorfnijih regiona u humanom genomu (Spies et al. 1986).

U promotorskom regionu gena za TNF α identifikovana je bazna zamena G-308A koja je povezana sa povećanom transkripcionom aktivnošću (Wilson et al. 1997). U Bostonskoj studiji HOBP detektovana je njena udruženost sa bolešću, ali ovaj rezultat nije potvrđen u kasnijim studijama (Hersh et al. 2005). Istraživanja sprovedena na japanskoj i tajvanskoj populaciji su pokazala da G-308A može imati ulogu u patogenezi HOBP (Wood et al. 2006). Međutim, rezultati drugih studija sprovedenih u populacijama belaca nisu potvrdili njegovu povezanost sa bolešću. Takođe je uočena veza između smanjenja vrednosti FEF (eng. Forced Expiratory Flow) 25–75% i alela -308A (Matheson et al. 2006).

1.2.4.3.2. Drugi geni povezani sa inflamatornim procesima

Među analizirane genske varijante u okviru drugih gena, važnih za proces inflamacije, spadaju geni za IL1 β , IL4, IL13, IL11, IL6, IL10, IL8 i CXCR2. Alelske

varijante u pomenutim genima su uglavnom proučavane u pojedinačnim populacijama u Japanu, Egiptu, Nemačkoj, Španiji i Holandiji. Ustanovljeno je da predstavljaju faktore rizika ili protektivne faktore u nastanku HOBP, a neki od njih imaju modulatorno dejstvo na tok bolesti ili su povezani sa izvesnim plućnim parametrima. Međutim, rezultati najvećeg broja ispitivanih varijanti nisu replikovani u drugim populacijama ili su dobijeni nekonzistentni rezultati (Hegab et al. 2004, Hegab et al. 2005, van der Pouw Kraan et al. 2002, Córdoba-Lanús et al. 2008, Sampsonas et al. 2006).

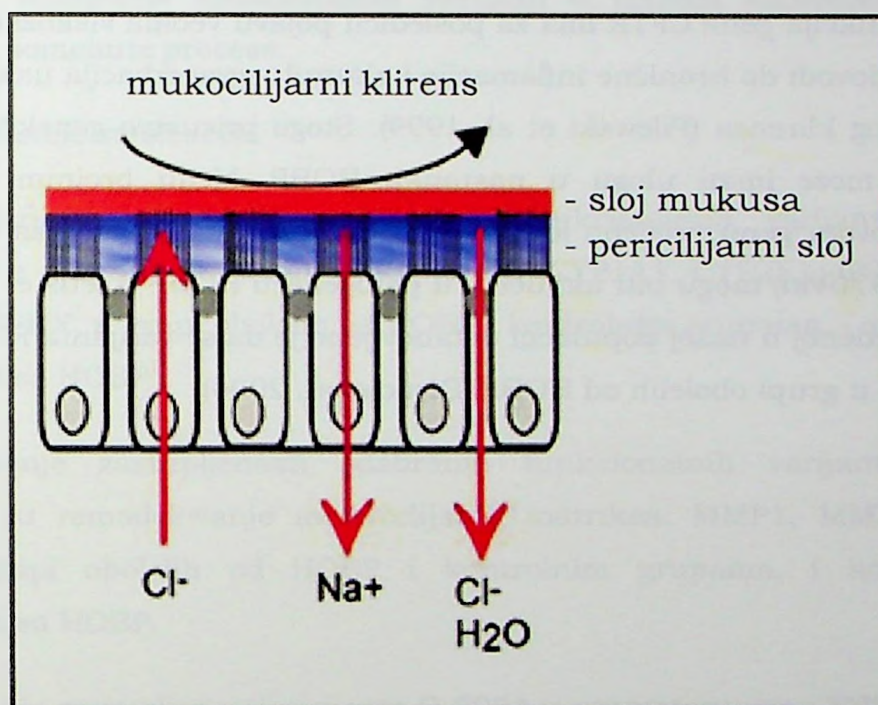
Pokazano je da genske varijante u Vitamin D vezujućem proteinu i TGF β 1 mogu imati protektivno dejstvo u HOBP. U Bostonskoj studiji identifikovana je veza između regiona hromozoma 19, u okviru koga je smešten gen za TGF β 1, i FEV₁ vrednosti. Tri varijante TGF β 1 gena su udružene sa smanjenim faktorom rizika za nastanak HOBP. Surfaktanti su hidrofobni proteini koji imaju ulogu u regulaciji površinskog napona alveola, odbrani organizma i kontroli inflamacije. U Bostonskoj studiji HOBP, pokazana je povezanost varijanti u genu za surfaktant B sa HOBP. (Celedón et al. 2004, Sampsonas et al. 2006).

1.2.4.4. Mukocilijarni klirens

Mukocilijarni klirens podrazumeva usklađenu aktivnost jonskog transporta, hidratacije, sekrecije mucina, aktivnosti cilija, kašlja i obezbeđuje stalni protok fluida i mukusa preko površine pluća. Pored uloge u mehaničkom čišćenju, sloj mukusa takođe sadrži antibakterijske supstance poput lizozima i laktoferina, migrirajuće ćelije poput makrofaga i signalne molekule kao što su citokini, što sprečava razvoj bakterija tokom procesa čišćenja. Za efikasnost procesa čišćenja neophodni su aktivnost cilija i dobra hidriranost mukusa (Button et al. 2008).

Tečnost koja oblaže unutrašnjost pluća, ASL (eng. Airway Surface Liquid) je od velikog značaja za održavanje procesa mukocilijarnog klirensa. Sloj mukusa, koji je u formi gela, sadrži mucine poreklom iz peharastih ćelija i žlezda i omogućava vezivanje i hvatanje štetnih čestica iz udahnutog vazduha. Zahvaljujući viskoelastičnim svojstvima ovog sloja, usled aktivnosti cilija sloj tečnosti se neprekidno pomera proksimalno, i u normalnim okolnostima tečnost koja dospe u zadnji farinks biva progutana. Viskoelastična svojstva ovog sloja zavise od sadržaja

mucina i hidratacije. Hidratacija predstavlja odraz ravnoteže između apsorpcije Na^+ putem epitelijalnog natrijuskog kanala, ENaC (eng. Epithelial Na Channel) i sekrecije Cl^- putem regulatora provodljivosti u cističnoj fibrozi, CFTR (eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Ispod sloja mukusa nalazi se pericilijarni sloj. Ovaj sloj ne samo da predstavlja efikasan lumbrikant koji omogućava aktivnost cilija, već zahvaljujući prisustvu velikih, razgranatih glikoproteina i vezanih mucina, u apikalnoj membrani epitelijalnih ćelija, sprečava prodiranje štetnih materija zarobljenih u sloju mukusa (Slika 9) (Button et al. 2008).



Slika 9. Mukocilijarni klirens. Tečnost koja oblaže unutrašnjost pluća obuhvata sloj mukusa i pericilijarni sloj. Preuzeto sa www.biologie.uni-regensburg.de.

HOBP se karakteriše disfunkcijom mukocilijarnog klirensa koji se javlja usled hipersekrecije mukusa kao i njegovim smanjenim transportom. Slično kao u slučaju cistične fibroze (CF) i kod HOBP usled hipersekrecije mukusa dolazi do gubitka pericilijarnog sloja tečnosti i adhezije sloja mukusa na površinu ćelija čime se redukuje mukocilijarni klirens i dolazi do zadržavanja štetnih čestica i bakterija.

1.2.4.4.1. Regulator provodljivosti u cističnoj fibrozi

Gen za cističnu fibrozu se nalazi na hromozomu 7q31. U plućima se eksprimira u ćelijama submukoznih žlezda i u ćelijama respiratornog epitela. Protein CFTR je smešten u apikalnoj membrani ćelija. Mutacije u genu CFTR dovode do cistične fibroze, najčešćeg monogenkog recesivnog oboljenja koje se završava smrtnim ishodom (Krauth et al. 2003). Međutim, promene u genu CFTR su povezane i sa etiologijom drugih bolesti, kao što su infertilitet kod muškaraca, hronični pankreatitis i diseminirane bronhiektazije (Dork et al. 1997, Ravnik-Glavac et al. 1996, Tzetis et al. 2001).

Izmenjena funkcija gena CFTR ima za posledicu pojavu veoma viskoznog sekreta u plućima što dovodi do hronične inflamacije i akutnih egzacerbacija usled oštećenog mukocilijarnog klirensa (Pilewski et al. 1999). Stoga prisustvo genskih varijanti u CFTR genu može imati ulogu u nastanku HOBP. Među brojnim varijantama opisanim u ovom genu, uočeno je da alel 5T polimorfnog Tn lokusa (IVS8) kao i 470Met (Met470Val) mogu biti uključeni u patogenezu HOBP (Tzetis et al. 2001). U studiji sprovedenoj u našoj populaciji ustanovljeno je da se varijanta R75Q i alel 5T češće javljaju u grupi obolelih od HOBP (Divac et al. 2004).

2. Cilj

Hronična opstruktivna bolest pluća je složeno oboljenje u čiji je razvoj uključen veliki broj genetičkih i sredinskih faktora kao i njihovih interakcija. I pored intenzivnih istraživanja, molekularni mehanizmi koji leže u osnovi ove bolesti još uvek nisu dovoljno razjašnjeni.

Na osnovu dosadašnjih saznanja predložen je model patogeneze HOBP koji obuhvata gene uključene u procese ravnoteže proteinaze-antiproteinaze, ravnoteže oksidanti-antioksidanti, inflamacije i mukocilijarnog klirensa. Stoga je osnovni cilj ove studije ispitivanje funkcionalnih varijanti u genima kandidatima, koji su uključeni u pomenute procese.

Ciljevi ove studije su sledeći:

1. Određivanje zastupljenosti odabranih funkcionalnih varijanti u genima uključenim u odbranu od oksidativnog stresa: CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 i mEPHX, u grupi obolelih od HOBP i kontrolnim grupama, i analiza njihove udruženosti sa HOBP.
2. Određivanje zastupljenosti odabranih funkcionalnih varijanti u genima uključenim u remodelovanje međućelijskog matriksa: MMP1, MMP9, MMP12 i α_1 AT, u grupi obolelih od HOBP i kontrolnim grupama, i analiza njihove udruženosti sa HOBP.
3. Određivanje zastupljenosti varijante G-308A u promotoru gena TNF α , uključenog u inflamatorne procese, u grupi obolelih od HOBP i kontrolnim grupama, i analiza njegove udruženosti sa HOBP.
4. Određivanje zastupljenosti genskih varijanti gena CFTR, uključenog u mukocilijarni klirens, F508del, M470V i 5T i skrining egzona 3, 10 i 11, u grupi obolelih od HOBP i kontrolnim grupama, i analiza njihove udruženosti sa HOBP.
5. Ispitivanje modulacionog uticaja pojedinačnih genotipova analiziranih gena na HOBP.
6. Ispitivanje uloge složenih genotipova gena uključenih u metabolizam ksenobiotika, remodelovanje međućelijskog matriksa, inflamaciju i mukocilijarni klirens u HOBP.

7. Statistička obrada podataka i selekcija složenog faktora rizika za HOBP za detaljnu funkcionalnu analizu.

8. Funkcionalna analiza odabranih faktora potencijalno uključenih u patogenezu HOBP.

3. Materijal i metode

3.1. Ispitanici

Ova studija je obuhvatila pacijente obolele od HOBP i kontrolne subjekte. Pacijenti su dijagnostikovani u Kliničko bolničkom centru Zvezdara u periodu od 2001-2007 godine. Dijagnoza bolesti postavljena je na osnovu istorije bolesti, lekarskog pregleda, testa plućne funkcije, gasne analize krvi i radiografije grudnog koša, prema kriterijumima Evropskog respiratornog društva (GOLD 2006). Parametri spirometrijskih vrednosti za dijagnostifikovanje HOBP su uključili: $(FEV_1)/(FVC) < 70\%$, postbronhodilatatorni $FEV_1 < 80\%$ od predviđene vrednosti prebronhodilatatora, reverzibilnost $< 12\%$ nakon primene kratkodelujućeg β_2 agonista i 200 mL prebronhodilatatora.

Kontrolna grupa je obuhvatila subjekte koji su vršili redovan medicinski pregled u Kliničko bolničkom centru Zvezdara. Kod svih subjekata pregledom je isključeno prisustvo HOBP, a parametri plućne funkcije su pokazali normalne vrednosti: $(FEV_1)/(FVC) > 70\%$ i $FEV_1 > 80\%$ od predviđene vrednosti.

Ispitanici obuhvaćeni ovom studijom dali su pismenu saglasnost za obavljanje molekularno-genetičkih analiza. Ovo istraživanje je odobrio etički komitet Kliničko bolničkog centra Zvezdara.

3.2. Materijal

3.2.1. Uzorci periferne krvi

Uzorci periferne krvi pacijenata i subjekata kontrolne grupe su uzimani sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom u odnosu 9:1 i skladišteni na $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Uzorci periferne krvi su korišćeni za izolovanje DNK koja je korišćena u daljoj analizi.

3.2.2. Čelijska linija

U ovom radu korišćena je permanentna humana čelijska linija U937 poreklom iz pleuralnog punktata pacijenta obolelog od difuznog histiocitnog limfoma (Sundström et al. 1976). Čelije monocitne leukemične linije U937 pokazuju karakteristike slične monocitima i mogu se diferencirati u makrofage.

Čelijska linija U937 je korišćena za izolovanja DNK, totalne RNK i tranzijentne transfekcije, dok je medijum u kome su čelije gajene analiziran metodom želatinskog zimograma.

3.2.3. Bakterijski sojevi

U radu su korišćeni bakterijski sojevi *E. coli* DH5a (*supE44 ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) (Gough et al. 1983) i XL 10-Gold (*Tet^R Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lac^kZΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]^o*) (Stratagene).

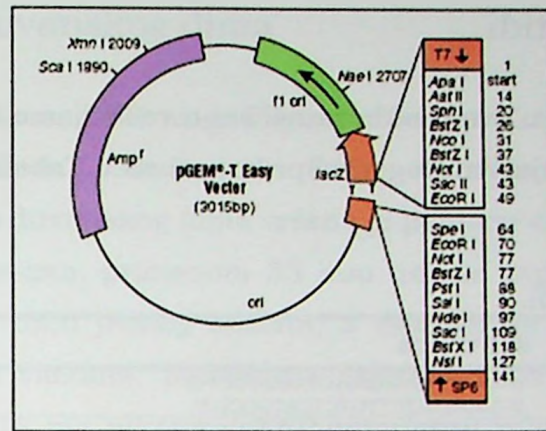
Soj *E. coli* DH5a je korišćen za transformaciju konstruktima pGEM-pMMP9 i pGL-pMMP9C, a XL 10-Gold za transformaciju konstruktom pGL-pMMP9T.

3.2.4. Plazmidni vektori

Vektor pGEM-T Easy je linearni vektor koji na oba 3' kraja sadrži timidin. Terminalni 3'-timidin omogućava efikasnu ligaciju PCR produkta i sprečava recirkularizaciju plazmida (Promega) (Slika 10). Vektor sadrži promotore za T7 i SP6 RNK polimeraze, mesto za kloniranje i kodirajući region za enzim β galaktozidazu, čime je omogućena plavo-bela selekcija klonova. U vektoru se nalazi i kodirajući region za β laktamazu, enzim koji omogućava rezistenciju na ampicilin.

pGEM-T Easy vektor je korišćen za kloniranje promotorskog regiona gena MMP9, umnoženog u PCR reakciji.

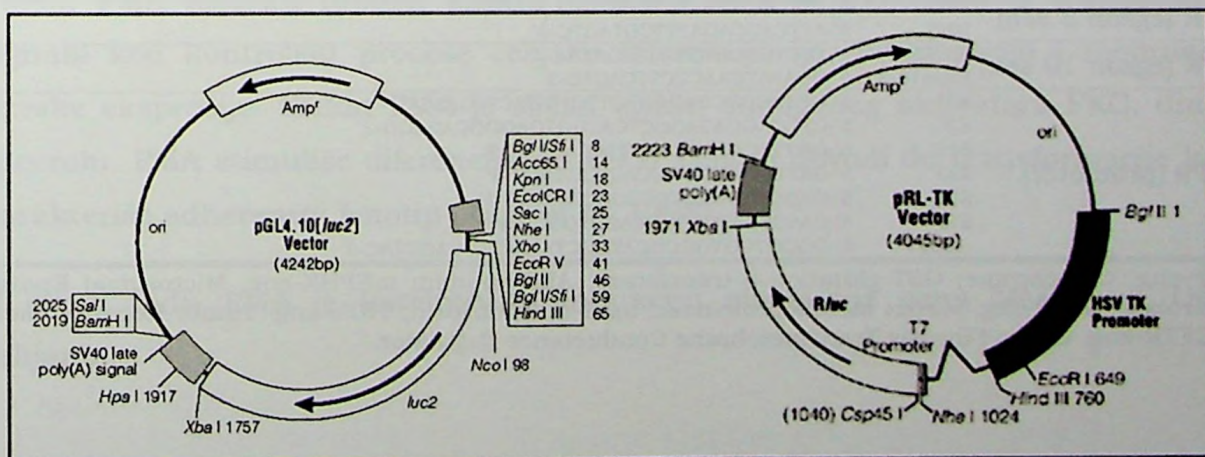
Materijal i metode



Slika 10. Šematski prikaz pGEM-T Easy vektora. Preuzeto sa www.promega.com.

Reporter vektor pGL4.10[*luc2*] sadrži sintetičku sekvencu za “firefly” luciferazu (*luc2*) poreklom iz svica (*Photinus pyralis*) (Slika 11). Vektor pGL4.10[*luc2*] sadrži mesto za kloniranje smešteno ispred gena *luc2*, SV40 poliadenilacioni signal, *ColE1* oridžin replikacije i kodirajuću sekvencu za β laktamazu. Reporter vektor pRL-TK sadrži sekvencu koja kodira luciferazu poreklom iz *Renilla reniformis* (Slika 11). Ekspresija *Renilla* luciferaze je pod kontrolom promotora za timidin kinazu (TK) poreklom iz HSV (eng. Herpes Simplex Virus), koji omogućava nisku do umerenu ekspresiju. Vektor sadrži himerni intron, promotor za T7 RNK polimerazu, SV40 poliadenilacioni signal i sekvencu za β laktamazu.

Luciferazni reporter sistem (Dual-Luciferase Reporter Assay System) (Promega), koji se sastoji od vektora pGL4.10[*luc2*] i pRL-TK, je korišćen za funkcionalnu analizu promotora gena MMP9. Za ispitivanje aktivnosti promotora MMP9 korišćen je vektor pGL4.10[*luc2*], a za određivanje efikasnosti transfekcije vektor pRL-TK.



Slika 11. Šematski prikaz pGL4.10[*luc2*] i pRL-TK vektora. Preuzeto sa www.promega.com.

3.2.5. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi, koji su u ovom radu korišćeni u reakcijama lančanog umnožavanja DNK (PCR), sekvenciranju i mutagenezi prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Oligonukleotidi.

gen (alel ili lokus)	naziv	sekvenca
CYP1A1 (*1A/*2A)	CYP1A1F	5'-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3'
	CYP1A1R	5'-TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT-3'
CYP2E1 (*1A/*5B)	CYP2E1F	5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3'
	CYP2E1R	5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3'
GSTM1 (+/-)	GSTM1F	5'-GAACTCCCTGAAAACCTAAAG-3'
	GSTM1R	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'
GSTT1 (+/-)	GSTT1F	5'-TTCCTTACTGGTCTCACATCTC-3'
	GSTT1R	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
ALB	ALBF	5'-GCCCTCTGCTAACCAAGTCTAC-3'
	ALBR	5'-GCCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC-3'
GSTP1 (Ile105Val)	GSTP1F	5'-GTAGTTTGCCCAAGGTCAAG-3'
	GSTP1R	5'-AGCCACCTGAGGGGTAAG-3'
mEPHX (S)	EPO1	5'-GATCGATAAGTTCCGTTTACC-3'
	EPO2	5'-ATCCTTAGTCTTGAAGTGAGGAT-3'
mEPHX (F)	EPO3	5'-ACATCCACTTCCACAGT-3'
	EPO4	5'-ATGCCTCTGAGAAGCCAT-3'
MMP1 (G-1607GG)	MMP1F	5'-TGAGAAGAGGATTTCTTTTCGTG-3'
	MMP1R	5'-GGATTCTGTTTCTTCTTTCGCGTC-3'
MMP9 (C-1562T)	MMP9F	5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3'
	MMP9R	5'-CTTCTAGCCAGCCGGCATC-3'
MMP12 (A-82G)	MMP12F	5'-GAGATAGTCAAGGGATGATATCAGC-3'
	MMP12R	5'-AAGAGCTCCAGAAGCAGTGG-3'
α_1 AT (PI M/Z)	ZF	5'-GCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGTC-3'
	ZR	5'-TTGAGGAGCGAGAGGCAGTT-3'
α_1 AT (PI M/S)	SF	5'-CCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTCG-3'
	SR	5'-CAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG-3'
TNF α (G-308A)	Tnfa-308 5'	5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'
	Tnfa-308 3'	5'-GAGCGTCTGCTGGCTGGGTG-3'
CFTR (F508del)	BH8	5'-GCACCATTAAGAAAATATGAT-3'
	BH9	5'-CATTACAGTAGCTTACCA-3'
CFTR (M470V)	10i-5	5'-TTGTGCATAGCAGAGTACCTGAAA-3'
	10i-3	5'-GCTTCTTAAAGCATAGGTCATGTG-3'
CFTR (Tn lokus)	CF9RR	5'-GACATGGACACCAAATTAAG-3'
	CF7T	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTTTGT-3'
	CF5T	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTTGT-3'
CFTR (egzon 3)	GCCF3	5'-GCCCGCCGTCGCGGCCGACCCCGCGCGTCCGGCGCCCGTTCGTTAGTCTTTTCATAATC-3'
	CF3	5'-TTGGATATACTGTGTGAAT-3'
CFTR (egzon 10)	GCCF10	5'-CGGGCGCCGACGCGCGGGGTGCGGGCCGGCGGCATTTGGGTAGTGTGAAGGG-3'
	CF10	5'-TCCTGAGCGTGATTTGATAA-3'
CFTR (egzon 11)	GCCF11	5'-GCCCGCCGCGCCGACCCCGCGCGTCCGGCGCCCGCAGATTGAGCATACTAAAAGTG-3'
	CF11	5'-CATTTACAGCAAATGCTTGCTAG-3'
CFTR (egzon 3 sek)	P3i5'	5'-CTTGGTTAATCTCCTTGA-3'
	P3i5'	5'-ATTCACCAGATTCGTAGTC-3'
CFTR (egzon 10 sek)	ICCF10F	5'-TCCTGAGCGTGATTTGATAA-3'
	Exon10-3	5'-GCATATGAACCTTCACAC-3'
MMP9 (promotor)	K5'	5'-GGTACCGCCAGGCACTTCTGGGCTTGAAC-3'
	K3'	5'-CTCGAGCAGAGGCTCATGGTGAGGGCAGAGG-3'
	S25'	5'-GGTTACTGTCAGCTTAGAGCCC-3'
	S23'	5'-GATTATGTCAGTCACTCCAGCC-3'
	S15'	5'-GAGCCTGGAGTGTGGGGAGGGG-3'
	S13'	5'-CAAGTGATCTGCCACCTGGCC-3'
	-1562T	5'-GGCGTGGTGGCGCATGCCTATAATACCAGCTAC-3'

CYP-eng. Cytochrome; GST-glutation-S-transferaza; ALB-abumin; mEPHX-eng. Microsomal Epoxide Hydrolase; MMP-eng. Matrix Metalloproteinase; α_1 AT- α_1 antitripsin; TNF α -eng. Tumor Necrosis Factor α ; CFTR-eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.

3.2.6. Ekstrakt duvanskog dima

Ekstrakt duvanskog dima, CSC (eng. Cigarette Smoke Condensate) je pripremljen na Kentaki Univerzitetu (Leksington, SAD) od referentnih cigareta 1R3F. Pripremanje ekstrakta duvanskog dima vršeno je pomoću mašine za pušenje prema standardnim ISO uslovima, primenom 35 mm usisne zapremine u trajanju od 2 sekunde jedan put u toku jednog minuta, a ekstrakt je sakupljen na Kembridž filterima od staklenih vlakana. Referentna cigareta 1R3F sadrži 18,1 mg čvrste supstance od toga 1,16 mg nikotina, 17,2 mg ugljen-monoksida i 0,27 mg azot-oksida. CSC je pripreman rastvaranjem čvrste materije sa filtera u dimetil-sulfoksidu (DMSO) tako da je finalno dobijen 4% rastvor CSC koji je skladišten na -80 °C do korišćenja.

Korišćenje ekstrakta duvanskog dima pripremljenog od referentnih cigareta omogućava poređenje rezultata dobijenih u različitim laboratorijama (Research Cigarettes).

U ovom radu CSC je korišćen za tretman ćelija U937 u cilju analize ekspresije gena MMP9.

3.2.7. Forbol miristat acetat

Forbol-miristat-acetat, PMA (eng. Phorbol-12-myristate-13-acetate) (Sigma), poznat i kao 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetat, TPA (eng. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate), je diestar forbola koji ima snažno tumorogeno dejstvo (Krauter et al. 1996). PMA aktivira protein kinazu C (PKC) koja je uključena u transdukciju signala koji kontrolišu procese ćelijske diferencijacije, proliferacije i modulacije genske ekspresije. Efekat PMA je sličan efektu endogenog aktivatora PKC, diacil-glicerolu. PMA stimuliše diferencijaciju U937 ćelija i dovodi do transformacije koju karakteriše adherentni fenotip (Ragg et al. 1998).

U ovom radu PMA je korišćen za indukciju ekspresije gena MMP9 na U937 ćelijama.

3.3. Metode

3.3.1. Izolovanje nukleinskih kiselina

3.3.1.1. Izolovanje genomske DNK

Za izolovanje DNK iz limfocita periferne krvi i ćelija gajenih u kulturi korišćen je komercijalni kit GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences). Izolovanje je vršeno prema uputstvu proizvođača:

- U 100 μL krvi ili taloga ćelija (2×10^6 ćelija) doda se 500 μL rastvora za ekstrakciju (Extraction Solution). Smeša se promeša na vorteksu i inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi.
- Smeša se nanese na kolonu i centrifugira na 8000 obr/min (Eppendorf MINISPIN Micro Centrifuge) 1 minut.
- Na kolonu se doda 500 μL rastvora za ekstrakciju i centrifugira se na 8000 obr/min 1 minut.
- Zatim se na kolonu doda 500 μL rastvora za pranje (Wash Solution) i centrifugira se na 13000 obr/min 3 minuta.
- Kolona se prebaci u epruvetu za eluciju DNK i doda se 100 μL sterilne vode, zagrejane na 70 °C. Kolona se inkubira na sobnoj temperaturi 1 minut, a zatim centrifugira na 8000 obr/min 1 minut.

Na ovaj način se dobija izolovana DNK rastvorena u vodi. Uobičajeni prinos iznosi 30-50 ng/ μL .

U ovom radu izolovana je DNK iz uzoraka krvi obolelih od HOBP, uzoraka kontrolne grupe i ćelija U937.

3.3.1.2. Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali

Izolacija plazmidne DNK iz bakterija vršena je komercijalnim kitom QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) prema uputstvu proizvođača:

- Pojedinačne bakterijske kolonije se zaseju u 2-3 ml tečnog LB (Luria-Bertani) medijuma sa antibiotikom i inkubiraju preko noći na 37 °C pri 180 obr/min.

- Bakterijska kultura se centrifugira na 13000 obr/min 5 minuta. Supernatant se odlije, a talog se resuspenduje u 250 μ l pufera P1.
- U smešu se doda 250 μ l pufera P2 i sadržaj se promeša invertovanjem epruvete.
- Doda se 350 μ l pufera N3 i promeša invertovanjem. Smeša se centrifugira na 13000 obr/min 10 minuta.
- Supernatant se nanese na QIAprep kolonu i centrifugira na 13000 obr/min 1 minut.
- Na kolonu se doda 500 μ l pufera PB i centrifugira na 13000 obr/min 1 minut.
- Na kolonu se doda 750 μ l pufera PE i centrifugira se na 13000 obr/min 1 minut.
- Da bi se odstranili tragovi etanola iz PE pufera, kolona se još jednom centrifugira na 13000 obr/min 1 minut.
- Kolona se prebaci u čistu epruvetu, doda se 40 μ l pufera EB i centrifugira na 13000 obr/min 1 minut.

Na ovaj način se dobija do 20 μ g plazmidne DNK.

U ovom radu izolovana je plazmidna DNK iz transformanata bakterija *E. coli* sojeva DH5 α i XL 10-Gold u kojima su propagirani konstrukti pGEM-pMMP9, pGL-pMMP9C i pGL-pMMP9T.

3.3.1.3. Izolovanje plazmidne DNK na velikoj skali

Izolovanje plazmidne DNK koja je oslobođena od endotoksina bakterija i može se koristiti za transfekcije ćelija u kulturi vršeno je EndoFree Plasmid Purification Maxi Kit-om (Qiagen). Endotoksini su lipopolisaharidi koji potiču iz ćelijske membrane Gram-negativnih bakterija, a njihovo prisustvo može značajno da umanji efikasnost transfekcije. Oni takođe indukuju nespecifični imunski odgovor u ćelijama imunskog sistema poput makrofaga. Plazmidna DNK dobijena EndoFree kitom je većeg stepena čistoće u poređenju sa DNK koja je centrifugirana dva puta u gradijentu cezijum-hlorida. Izolacija je vršena prema uputstvu proizvođača (Qiagen):

- Pojedinačne bakterijske kolonije se zaseju u 5 mL selektivnog LB medijuma i inkubiraju na 37 °C uz mešanje na 180 obr/min 8 sati.
- U 100 mL selektivnog LB medijuma zaseje se 100 µL prekodnevne kulture i inkubira na 37 °C pri 180 obr/min 12 do 16 sati.
- Bakterijska kultura se zatim centrifugira (Eppendorf, klinička centrifuga) na 4700 obr/min na +4 °C 30 minuta.
- Talog se resuspenduje u 10 mL pufera P1, doda se 10 mL pufera P2, sadržaj se meša invertovanjem i inkubira na sobnoj temperaturi 5 minuta. Nakon toga doda se 10 mL pufera P3, temperiranog na +4 °C i smeša se promeša invertovanjem.
- Dobijeni ćelijski lizat se nanese na QIAfilter Cartridge i inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta. Zatim se lizat profiltrira.
- U filtrirani lizat doda se 2,5 mL pufera ER (pufer za uklanjanje endotoksina), smeša se promeša invertovanjem i inkubira na ledu 30 minuta. Za to vreme, ekvilibriše se QIAGEN-tip 500 kolona sa 10 ml pufera QBT.
- Na ekvilibrisanu kolonu nanosi se filtrirani lizat, pri čemu se DNK vezuje za kolonu.
- Nakon toga, QIAGEN-tip se ispira dva puta sa 30 mL pufera QC čime se spiraju RNK, proteini, metaboliti i drugi mali molekuli sa kolone.
- DNK se eluira puferom QN.
- DNK se precipitira dodavanjem 10,5 mL izopropanola i centrifugiranjem (Sorvall centrifuga, rotor SS-34) na 8000 obr/min, 30 minuta na +4 °C.
- Talog se ispira sa 5 mL 70% etanola i centrifugira se na 8000 obr/min, na +4 °C 10 minuta. Supernatant se pažljivo ukloni aspiracijom, a talog se suši na vazduhu.
- Talog plazmidne DNK se rastvori u 200 µL pufera TE i nakon merenja koncentracije čuva na -20 °C.

Na ovaj način se dobija do 500 µg plazmidne DNK.

U ovom radu izolovanjem plazmidne DNK na velikoj skali prečišćeni su vektori pGL-pMMP9C, pGL-pMMP9T, pGL4.10[luc2] i pRL-TK.

3.3.1.4. Izolovanje totalne RNK

Izolacija totalne RNK iz ćelija vršena je RNeasy Plus Mini Kit-om (Qiagen) prema uputstvu proizvođača:

- Ćelijski talog se lizira u 350 μ L RTL Plus pufera. Lizat se resuspenduje i prebaci na QIAshredder kolonu i centrifugira na 13000 obr/min 2 minuta.
- Da bi se oslobodili DNK, homogenizovani lizat se nanese na kolonu gDNA Eliminator i centrifugira na 11000 obr/min 30 sekundi.
- Nakon toga eluatu se doda 350 μ L 70% etanola, smeša se prebaci na Rneasy kolonu i centrifugira na 11000 obr/min 15 sekundi.
- Na kolonu se doda 700 μ L pufera RW1 i kolona se centrifugira na 11000 obr/min 15 sekundi.
- Na kolonu se doda 500 μ L pufera RPE i kolona se centrifugira na 11000 obr/min 15 sekundi.
- Na kolonu se ponovo doda 500 μ L pufera RPE i kolona se centrifugira na 11000 obr/min 2 minuta. Kolona se još jednom centrifugira na 13000 obr/min 1 minut, kako bi se uklonili svi tragovi pufera.
- Zatim se kolona prenese u novu epruvetu, doda se 25-35 μ L vode i centrifugira se na 13000 obr/min 1minut.

Kvalitet izolovane RNK proverava se elektroforezom na 1% agaroznom gelu, a koncentracija RNK se određuje na Nanoview aparatu (GE Healthcare). RNK se čuva na -20 °C.

U ovom radu totalna RNK je izolovana iz indukovanih U937 ćelije.

3.3.2. Sinteza cDNK

Sinteza cDNK vrši se pomoću High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a (Applied Biosystems). U prisustvu nasumičnih prajmera i reverzne transkriptaze totalna iRNK se prevodi u jednolančanu cDNK, koja se koristi za kvantifikaciju u reakciji real-time PCR. Sastav i temperaturni uslovi reakcije reverzne transkripcije prikazani su u Tabeli 2.

Za sintezu cDNK korišćena je totalna RNK izolovana iz indukovanih U937 ćelije.

Tabela 2. Sastav i uslovi reakcije reverzne transkripcije.

sastav i volumen smeše	temperaturni uslovi
1 X RT pufer	25 °C 10'
0,8 µL 25 X dNTP	
2 µL 10 X Random prajmera	37 °C 120'
1 µL MultiScribe reverzne transkriptaze	85 °C 5"
1000 ng RNK	4 °C ∞
H ₂ O bez RNaze do 20 µL	

3.3.3. Metode za detekciju genskih varijanti

Za detekciju genskih varijanti korišćene su: metoda multipleks reakcije lančanog umnožavanja DNK, PCR (eng. Polymerase Chain Reaction), metoda polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata, RFLP (eng. Restriction Fragment Length Polymorphism), metoda specifične mutageneze posredstvom PCR reakcije, PSM (eng. PCR-Mediated Site Directed Mutagenesis) i metoda konformaciono senzitivne gel elektroforeze, CSGE (eng. Conformation Sensitive Gel Electrophoresis). Za pretraživanje egzona 3, 10 i 11 gena CFTR korišćena je metoda elektroforeze u gelu sa gradijentom denaturišućeg agensa, DGGE (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), a detektovane promene su okarakterisane metodom sekvenciranja DNK. Pregled metoda koje su u ovom radu korišćene za detekciju ispitivanih genskih varijanti prikazan je u Tabeli 3.

Tabela 3. Pregled metoda koje su korišćene za detekciju ispitivanih varijanti gena.

gen (alel ili lokus)	genska lokacija	metoda za detekciju	literatura
CYP1A1(*1A/*2A)	3' flanking	PCR-RFLP	Hayashi ¹ et al. 1991
CYP2E1 (*1A/*5B)	promotor	PCR-RFLP	Kato et al. 1992
GSTM1 (+/-), GSTT1 (+/-)	kodirajuć region	multipleks PCR	Arand et al. 1996
GSTP1 (Ile105Val)	egzon 5	PCR-RFLP	Ishii et al. 1999
mEPHX (Tyr113His)	egzon 3	PSM-RFLP	Smith et al. 1997
mEPHX (His139Arg)	egzon 4	PCR-RFLP	Smith et al. 1997
MMP1 (G-1607GG)	promotor	CSGE	Stankovic ¹ et al. 2009
MMP9 (C-1562T)	promotor	PCR-RFLP	Yanchina et al. 2004
MMP12 (A-82G)	promotor	PSM-RFLP	Joos et al. 2002
α ₁ AT (PI Z)	egzon 5	PSM-RFLP	Lucotte et al. 1999
α ₁ AT (PI S)	egzon 3	PSM-RFLP	Lucotte et al. 1999
TNFα (G-308A)	promotor	PSM-RFLP	Sakao et al. 2001
CFTR (F508del)	egzon 10	PSM-RFLP	Friedman et al. 1991
CFTR (M470V)	egzon 10	PCR-RFLP	Fujiki et al. 2004
CFTR (Tn lokus)	intron 8	PSM-RFLP	Shrimpton 2000
CFTR (egzoni 3, 10 i 11)	egzon 3, 10 i 11	DGGE	Fanen et al. 1992 Costes et al. 1993

CYP-eng. Cytochrome; GST-glutation-S-transferaza; mEPHX-eng. Microsomal Epoxide Hydrolase; MMP-eng. Matrix Metalloproteinase; α₁AT-α₁ antitripsin; TNFα-eng. Tumor Necrosis Factor α; CFTR-eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; PCR-eng. Polymerase Chain Reaction; RFLP-eng. Restriction Fragment Length Polymorphism; PSM-eng. PCR-Mediated Site Directed Mutagenesis; CSGE (eng. Conformation Sensitive Gel Electrophoresis); DGGE-eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.

3.3.3.1. Reakcija lančanog umnožavanja DNK

Reakcija lančanog umnožavanja DNK predstavlja *in vitro* amplifikaciju određenog segmenta DNK ograničenog sa dva oligonukleotida (prajmera). Prajmeri su dugački 20-ak nukleotida, komplementarni su krajevima sekvence koja se umnožava i međusobno suprotno orjentisani. PCR reakciona smeša, u kojoj se odigrava *in vitro* sinteza određenog segmenta DNK sadrži: DNK matricu, prajmere, dezoksiribonukleotidtrifosfate (dNTP), *Taq* polimerazu, Mg^{+2} jone i pufer koji omogućava optimalni rad *Taq* polimeraze. Reakcija umnožavanja se odvija tokom 25-40 ciklusa, a svaki ciklus se sastoji iz tri koraka: denaturacije DNK, vezivanja prajmera i ekstenzije prajmera, što za rezultat ima eksponencijalnu amplifikaciju specifičnog DNK fragmenta. Sastavi reakcionih smeša i temperaturni uslovi umnožavanja segmenata DNK u PCR reakcijama prikazani su u Tabeli 4.

Prinos PCR reakcija je proveren agaroznom elektroforezom.

U ovom radu multipleks PCR metoda je korišćena za detekciju varijanti u genima GSTM1 i GSTT1, Tabela 3.

3.3.3.2. Metoda polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata

Primena metode PCR-RFLP omogućava direktnu detekciju mutacija i polimorfizama. U zavisnosti od toga da li je ispitivana promena prisutna ili odsutna iz sekvence DNK zavisice i očuvanost mesta prepoznavanja određene restrikcione endonukleaze. Obrada PCR fragmenta određenim restrikcionim enzimom, rezultuje dobijanjem DNK fragmenata različite dužine. Nakon razdvajanja produkata digestije na agaroznom gelu prisustvo promene potvrđuje određeni obrazac traka.

U ovom radu PCR-RFLP metodom detektovane su promene u CYP1A1, CYP2E1, GSTP1, mEPHX (F), MMP9 i CFTR (M470V) genima, Tabela 3.

Tabela 4. Uslovi umnožavanja fragmenata DNK u PCR reakciji.

genska varijanta	sastav i volumen smeše	temperaturni uslovi
CYP1A1 *1A/*2A	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'
	200 µM dNTP	
	1,5 mM MgCl ₂	94 °C 45"
	3 pmol prajmera CYP1A1F/CYP1A1R	60 °C 30"
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 30"
	100-150 ng DNK	
	25 µL	72 °C 7'
CYP2E1 *1A/*5B	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'
	200 µM dNTP	
	4 mM MgCl ₂	94 °C 1'
	10 pmol prajmera CYP1A1F/CYP1A1R	60 °C 1'
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 1'
	150-250 ng DNK	
	50 µL	72 °C 7'
GSTM1 +/- GSTT1 +/-	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 10'
	200 µM dNTP	
	4 mM MgCl ₂	94 °C 1'
	10 pmol prajmera GSTM1F/GSTM1R	58 °C 30"
	12 pmol prajmera GSTT1F/GSTT1R	72 °C 45"
	10 pmol prajmera ALBF/ALB1R	
	3 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 7'
	300-400 ng DNK	
	30 µL	
GSTP1 Ile105Val	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'
	200 µM dNTP	
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 30"
	2 pmol prajmera GSTP1F/GSTP1R	57 °C 30"
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 30"
	100-150 ng DNK	
	30 µL	72 °C 7'
mEPHX Tyr113His	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'
	200 µM dNTP	
	1,5 mM MgCl ₂	94 °C 30"
	10 pmol prajmera EPO1/EPO2	52 °C 1'
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 20"
	150-200 ng DNK	
	25 µL	72 °C 7'
mEPHX His139Arg	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'
	200 µM dNTP	
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 30"
	5 pmol prajmera EPO3/EPO4	59 °C 20"
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 20"
	150-200 ng DNK	
	25 µL	72 °C 7'
MMP1 G-1607GG	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'
	200 µM dNTP	
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 30"
	3 pmol prajmera MMP1F/MMP1R	59 °C 45"
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 30"
	100-150 ng DNK	
	25 µL	72 °C 7'
MMP9 C-1562T	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'
	200 µM dNTP	
	4 mM MgCl ₂	94 °C 30"
	10 pmol prajmera MMP9F/MMP9R	65 °C 20"
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 20"
	150-250 ng DNK	
	30 µL	72 °C 7'
MMP12 A-82G	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'
	200 µM dNTP	
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 30"
	2,5 pmol prajmera MMP12F/MMP12R	59 °C 45"
	0,5 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 30"
	100-150 ng DNK	
	25 µL	72 °C 7'
α ₁ AT PI Z i S	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 10'
	200 µM dNTP	
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 30"
	5 pmol prajmera ZF/ZR	60 °C 30"
	5 pmol prajmera SF/SR	72 °C 30"
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	
	150-250 ng DNK	72 °C 7'
	25 µL	

Materijal i metode

TNF α G-308A	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'	30 ciklusa
	200 μ M dNTP		
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 1'	
	5 pmol prajmera Tnf α -3085'/Tnf α -3083'	62 °C 1'	
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 1'	
	250-350 ng DNK		
	25 μ L	72 °C 7'	
CFTR M470V	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'	30 ciklusa
	200 μ M dNTP		
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 1'	
	5 pmol prajmera 10i-5/10i-3	55 °C 1'	
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 1'	
	100-150 ng DNK		
	25 μ L	72 °C 7'	
CFTR Tn lokus	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'	35 ciklusa
	200 μ M dNTP		
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 1'	
	5 pmol prajmera CF9RR/CF7T ili CF5T	58 °C 1'	
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 1'	
	100-150 ng DNK		
	25 μ L	72 °C 7'	
CFTR F508del	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'	35 ciklusa
	200 μ M dNTP		
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 1'	
	5 pmol prajmera BH8/BH9	55 °C 2'	
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 1'	
	100-150 ng DNK		
	25 μ L	72 °C 7'	
CFTR egzon 3	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'	40 ciklusa
	200 μ M dNTP		
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 1'	
	5 pmol prajmera GCCF3/CF3	50 °C 1'	
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 2'	
	100-150 ng DNK		
	25 μ L	72 °C 7'	
CFTR egzon 10	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'	40 ciklusa
	200 μ M dNTP		
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 1'	
	5 pmol prajmera GCCF10/CF10	55 °C 1'	
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 2'	
	100-150 ng DNK		
	25 μ L	72 °C 7'	
CFTR egzon 11	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'	40 ciklusa
	200 μ M dNTP		
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 1'	
	5 pmol prajmera GCCF11/CF11	50 °C 1'	
	1 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	72 °C 2'	
	100-150 ng DNK		
	25 μ L	72 °C 7'	
CFTR egzon 3 sekvenciranje	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'	30 ciklusa
	200 μ M dNTP		
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 1'	
	25 pmol prajmera P3i5'/P3i3'	56 °C 1'	
	0,3 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	68 °C 1'	
	150-250 ng DNK		
	50 μ L	68 °C 10'	
CFTR egzon 10 sekvenciranje	1 X Reakcioni pufer B (Solis BioDyne)	94 °C 5'	30 ciklusa
	200 μ M dNTP		
	2,5 mM MgCl ₂	94 °C 1'	
	25 pmol prajmera ICCF10F/Exon10-3	56 °C 1'	
	0,3 U Taq (FIREPol) polimeraze (Solis BioDyne)	68 °C 1'	
	150-250 ng DNK		
	50 μ L	68 °C 10'	
MMP9 promotor	1 X Pfu pufer + MgSO ₄ (Fermentas)	95 °C 5'	35 ciklusa
	200 μ M dNTP		
	10 pmol prajmera K5'/K3'	95 °C 1'	
	2,5 U Pfu polimeraze (Fermentas)	69 °C 1'	
	300-500 ng DNK	72 °C 4'	
	sterilna H ₂ O do 50 μ L		
		72 °C 10'	

CYP-eng. Cytochrome; GST-glutation-S-transferaza; mEPHX-eng. Microsomal Epoxide Hydrolase; MMP-eng. Matrix Metalloproteinase; α_1 AT- α_1 antitripsin; TNF α -eng. Tumor Necrosis Factor α ; CFTR-eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.

3.3.3.3. Metoda specifične mutageneze posredstvom PCR reakcije

Ova metoda omogućava uvođenje restrikcionog mesta tokom PCR reakcije, kada u okviru određenog polimorfnog regiona ne postoji restrikciono mesto. Zamena jednog nukleotida u sekvenci prajmera kao i prisustvo ili odsustvo ispitivane promene u sekvenci DNK, dovešće do formiranja ili ukidanja mesta prepoznavanja određenog restrikcionog enzima.

U ovom radu primenom PSM-RFLP metode analizirane su promene u mEPHX (S), MMP12, α_1 AT (PI Z i S), TNF α i CFTR (F508del, Tn lokus) genima, Tabela 3.

3.3.3.4. Digestija PCR fragmenata

Nakon provere prinosa PCR reakcije agaroznom elektroforezom, vršena je digestija DNK fragmenata restrikcionim enzimima prema uputstvu proizvođača. Sastavi smeša za digestiju kao i uslovi digestije prikazani su u Tabeli 5.

Produkti digestije analizirani su agaroznom elektroforezom.

3.3.3.5. Konformaciono senzitivna gel elektroforeza

Metoda CSGE se zasniva na činjenici da blago denaturišući agensi u odgovarajućim puferima mogu istaći konformacione promene dvolančane DNK prouzrokovane pojedinačnim nesparenim bazama i povećati razliku u elektroforetskoj pokretljivosti između homodupleksa i heterodupleksa (Körkkö et al. 1998). Ova metoda je veoma osetljiva za PCR fragmente dužine do 450 bp.

Za analizu heterodupleksa metodom CSGE korišćen je 15% poliakrilamidni gel (akrilamid i 1,4-bis-(akriloil)-piperazin u odnosu 99:1) koji sadrži 10% etilen glikol, 15% formamid, 0,1% amonijum-persulfat (APS), 0,04% tetrametil-etilendiamine (TEMED) i 0,5 X Tris-aurinski (TTE) pufer (44 mM Tris, 14,5 mM Taurin, 0,1 mM EDTA pH 9,0). Da bi se formirali heterodupleksi, 2-3 μ L PCR uzorka se pre nanošenja na gel inkubira 5 minuta na 95 °C, a zatim 5 minuta na 59 °C, i drži na ledu do nanošenja na gel. Pre nanošenja na gel u uzorak se doda pufer (50% glicerol, 0,25% ksilen cijanol, 0,25% brom fenol plavo) u odnosu 1:1. Elektroforeza

se odvija u 0,5 X TTE puferu, pri konstantnoj snazi od 40 W u trajanju od 5-6 sati. Nakon elektroforeze vizuelizacija DNK u gelu je vršena bojenjem srebro-nitratom.

U ovom radu standardizovana je CSGE metoda za detekciju varijante G-1607GG u promotoru gena za MMP1, koja omogućava razdvajanje PCR fragmenata dužine 199 i 200 bp (Stankovic¹ et al. 2009).

3.3.3.6. Elektroforeza u gelu sa gradijentom denaturišućeg agensa

Metoda DGGE omogućava razdvajanje fragmenta DNK na osnovu topljivosti (Fanen et al. 1992, Costes et al. 1993). U poliakrilamidnom gelu sa gradijentom denaturišućeg agensa fragment DNK putuje u zavisnosti od svoje dužine dok ne dođe do tačke kada denaturišući agens prouzrokuje parcijalnu denaturaciju dvolančane DNK. Usled nastale konformacione promene DNK molekula, brzina elektroforetske migracije se naglo smanjuje. Svaka promena u sekvenci DNK rezultuje u promeni tačke u gelu na kojoj molekul počinje da denaturiše. Na jednom kraju molekula nalazi se GC fragment dužine 25-55 bp koji ima najvišu tačku topljenja, tako da svi ostali delovi molekula denaturišu pre njega. Ova tehnika najefikasnija je za otkrivanje promena u molekulu DNK dužine 100-500 bp. Kao konstantan denaturišući agens koristi se temperatura od 60 °C, dok gradijent denaturišućeg agensa u gelu čine urea (od 0,7 M do 4,2 M) i formamid (od 4% do 24%).

U analizi su korišćeni 6,5% poliakrilamidni gelovi (akrilamid i N,N'-metilenbisakrilamid u odnosu 39,625:1), sa 0,1% APS, 0,01% TEMED i 1 X Tris-acetatni (TAE) pufer (40 mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1 mM Na₂EDTA). Pre nanošenja na gel uzorci su denaturisani 5 minuta na 94 °C, renaturisani 5 minuta na temperaturi hibridizacije prajmera i inkubirani na ledu do nanošenja na gel. Elektroforeza je tekla u 1 X TAE puferu pri konstantnom naponu od 10 V/cm.

Nakon elektroforeze vizuelizacija DNK u gelu je vršena bojenjem srebro-nitratom.

U ovom radu metodom DGGE je vršeno pretraživanje egzona 3, 10 i 11 u genu CFTR.

Tabela 5. Uslovi digestije PCR fragmenata.

PCR fragment, dužina, bp	sastav i volumen smeše	temperaturni uslov
CYP1A1 339	1 X NEB 4 (Biolabs) 5 U <i>MspI</i> (Biolabs) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 25 µL	37 °C, preko noći
CYP2E1 410	1 X O pufer (Fermentas) 5 U <i>PstI</i> (Fermentas) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C, preko noći
CYP2E1 410	1 X Tango pufer (Fermentas) 5 U <i>RsaI</i> (Fermentas) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C, preko noći
GSTP1 430	1 X NEB 4 pufer (Biolabs) 5 U <i>BsmAI</i> (Biolabs) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	55 °C, preko noći
mEPHX 162	1 X NEB 3 pufer (Biolabs) 1 X BSA (100 µg/mL)(Biolabs) 5 U <i>EcoRV</i> (Biolabs) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C, preko noći
mEPHX 210	1 X Tango pufer (Fermentas) 5 U <i>RsaI</i> (Fermentas) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C, preko noći
MMP9 435	1 X B pufer (Fermentas) 5 U <i>PaeI</i> (Fermentas) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C, preko noći
MMP12 199	1 X G pufer (Fermentas) 5 U <i>PvuII</i> (Fermentas) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C, 2h
α_1 AT Z: 210 S: 146	1 X Taq [®] pufer (Biolabs) 1 X BSA (100 µg/mL) (Biolabs) 5 U <i>TaqI</i> (Biolabs) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	65 °C, 2h
TNF α 345	1 X NEB 3 pufer (Biolabs) 5 U <i>NcoI</i> (Biolabs) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C, preko noći
CFTR M470V 491	1 X NEB 4 pufer (Biolabs) 5 U <i>HpaI</i> (Biolabs) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C, preko noći
CFTR Tn lokus 261	1 X NEB 4 pufer (Biolabs) 5 U <i>HpaI</i> (Biolabs) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C, preko noći
CFTR Tn lokus 261	1 X NEB 4 pufer (Biolabs) 5 U <i>HpaI</i> (Biolabs) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C, preko noći
CFTR F508del 219	1 X NEB 4 pufer (Biolabs) 5 U <i>MboI</i> (Biolabs) 15 µL PCR smeše sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C, preko noći

CYP-eng. Cytochrome; GST-glutation-S-transferaza; mEPHX-eng. Microsomal Epoxide Hydrolase; MMP-eng. Matrix Metalloproteinase; α_1 AT- α_1 antitripsin; TNF α -eng. Tumor Necrosis Factor α ; CFTR-eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.

3.3.4. Elektroforeza nukleinskih kiselina u agaroznom gelu

Horizontalna elektroforeza na agaroznom gelu predstavlja jednostavan i često korišćen metod za razdvajanje i analizu molekula nukleinskih kiselina (Maniatis et al. 1989). Vizuelizacija DNK omogućena je dodavanjem etidijum bromida u gel. Nakon osvetljavanja UV svetlošću talasne dužine 266 nm dolazi do fluorescencije molekula DNK. DNK je vizuelizovana na CCD kameri sa BioDocAnalyze sistemom.

Zavisno od veličine molekula DNK koji se analizira korišćeni su agarozni gelovi različite gustine. U gelove se nakon kuvanja dodaje etidijum bromid u koncentraciji od 1 µg/mL. Elektroforeza se vrši u TAE ili Tris-boratnom (TBE) puferu (100 mM Tris, 83 mM borna kiselina, 1 mM EDTA pH 8) pri voltaži od 7-10 V/cm.

U ovom radu, za analizu prinosa i kvaliteta molekula DNK i RNK ili za prečišćavanje molekula DNK korišćena je elektroforeza u 1% agaroznom gelu u TAE puferu. Za proveru produkata PCR reakcije korišćeni su 2% agarozni gelovi, a elektroforeza je tekla u TAE puferu. Za detekciju varijanti u genima CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, mEPHX (S), mEPHX (F), MMP9, MMP 12, α_1 AT (PI Z i PI S), TNF α i CFTR (M470V, Tn lokus i F508del) korišćene su 2%, 3%, 3,5% i 4% agarozne ili NuSieve-Seakem (FMC) (3:1) agarozne elektroforeze u TBE puferu. NuSieve-Seakem agarozni gelovi u poredenju sa običnim agaroznim gelovima, omogućavaju bolje razdvajanje fragmenata DNK i oštriju rezoluciju.

3.3.5. Bojenje poliakrilamidnih gelova srebro-nitratom

Vizuelizacija DNK na poliakrilamidnom gelu vršena je bojenjem srebro-nitratom sledećim postupkom (Radojkovic et al. 2000):

- Poliakrilamidni gel se nakon elektroforeze fiksira 30 minuta u rastvoru 10% etanola i 0,5% sirćetne kiseline.
- Nakon toga, gel se boji u 0,1% rastvoru srebro-nitrata 10 minuta, a višak srebra se uklanja ispiranjem u bidestilovanoj vodi.
- Zatim se doda razvijač: 1,5% natrijum-hidroksid, 0,01% natrijum-borhidrid i 0,048% formaldehid. Gel se u razvijaču inkubira 20 minuta.
- DNK se u gelu fiksira pomoću 0,75% natrijum-bikarbonata u trajanju od 20 minuta.

3.3.6. Prečišćavanje DNK iz rastvora

Prečišćavanje DNK fragmenata vršeno je komercijalnim kitom QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) prema uputstvu proizvođača:

- U 25 μL produkta PCR reakcije doda se 200 μL pufera PB. Smeša se nanese na kolonu i centrifugira na 13000 obr/min 1 minut.
- Kolona se dva puta ispira sa po 750 μL pufera PE i centrifugira na 13000 obr/min po 1 minut.
- Kolona se prebaci u novu epruvetu, doda se 15 μL sterilne vode i nakon 5 minuta DNK se eluira sa kolone centrifugiranjem na 13000 obr/min 1 minut.

U ovom radu prečišćavani su fragmenti DNK umnoženi u PCR reakciji.

3.3.7. Prečišćavanje DNK iz agaroznog gela

Prečišćavanje DNK iz agaroznog gela vršeno je komercijalnim kitom QIAEX II Agarose Gel Extraction (Qiagen) prema protokolu proizvođača:

- Nakon elektroforeze sterilnim skalpelom se iseče deo gela u kome se nalazi ciljani DNK fragment, odmeri se na vagi i prebaci u epruvetu.
- U epruvetu se zatim doda tri volumena pufer QX1 (u odnosu na volumen gela), 10 μL QIAEX II matriksa i smeša se zatim inkubira na 50 °C 10 minuta uz povremeno mešanje.
- Uzorak se centrifugira na 13000 obr/min 30 sekundi i supernatant se ukloni pipetom.
- Talog se resuspenduje u 500 μL pufera QX1, centrifugira na 13000 obr/min 30 sekundi i supernatant se ukloni.
- Talog se dva puta pere sa 500 μL pufera i nakon uklanjanja supernatanta ostavi na vazduhu da se osuši dok ne postane potpuno beo.
- Da bi se DNK eluirala sa matriksa doda se 20 μL sterilne vode, resuspenduje mešanjem na vorteksu i inkubira na sobnoj temperaturi 5 minuta.
- Uzorak se zatim centrifugira na 13000 obr/min 30 sekundi, a supernatant, DNK rastvorena u vodi, se prebaci u novu epruvetu.

U ovom radu iz agaroznog gela prečišćavani su DNK fragmenti dobijeni digestijom plazmidne DNK ili umnožavanjem u PCR reakciji.

3.3.8. Digestija plazmidne DNK

Digestija plazmidne DNK vršena je odgovarajućim restrikcionim enzimima prema uputstvu proizvođača. Uslovi digestija pGEM-pMMP9 i pGL vektora su prikazani u Tabeli 6.

Tabela 6. Uslovi reakcija digestije pGEM-pMMP9 i pGL vektora.

fragment	sastav i volumen smeše	temperaturni uslov
pGEM-pMMP9	1 X NEB Eco RI (Biolabs) 5 U EcoRI (Biolabs) 300-500 ng pGEM-pMMP9 sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C preko noći
pGEM-pMMP9	1 X Tango pufer (Fermentas) 15 U KpnI (Fermentas) 15 U XhoI (Fermentas) 300-500 ng pGEM-pMMP9 sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C 4 h
pGL	1 X R pufer (Fermentas) 15 U XhoI (Fermentas) 300-500 ng pGL sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C 4 h
pGL Xho I	1 X Kpn I pufer (Fermentas) 15 U KpnI (Fermentas) 300-500 ng pGL Xho I sterilna H ₂ O do 20 µL	37 °C 4 h

MMP-eng. Matrix Metalloproteinase.

U ovom radu digestija plazmidne DNK je vršena prilikom izbacivanja inserta iz pGEM-pMMP9 vektora i linearizacije pGL vektora.

3.3.9. Reakcija ligacije DNK

U reakciji ligacije formira se rekombinantni DNK molekul spajanjem linearizovanog plazmida i PCR fragmenta. Ligacija prečišćenog PCR fragmenta sa vektorom pGEM T-Easy vršena je komercijalnim kitom pGEM-T Easy Vector System (Promega) prema uputstvu proizvođača.

Pošto PCR fragmenti dobijeni umnožavanjem *Pfu* polimerazom imaju ravne krajeve, reakciji ligacije prethodila je reakcija dodavanja adeninskih repića. Uslovi reakcije dodavanja adeninskih repića FIRE *Taq* polimerazom su prikazani u Tabeli 7.

Tabela 7. Uslovi reakcije za dodavanje adeninskih repića.

sastav i volumen smeše	temperatura
1X Reaction buffer B (Solis BioDyne)	70 °C 30'
200 µM dATP	
2,5 mM MgCl ₂	
5 U FIRE Pol DNA Polymerase (Solis BioDyne)	
6 µL prčišćenog PCR produkta	
H ₂ O do 10 µL	

Uslovi reakcije ligacije pGEM-T Easy vektora i promotora MMP9 (umnoženog u PCR reakciji, Tabela 4) kao i linearizovanog plazmida pGL (KpnI/XhoI) i inserta promotora MMP9 (obrađenog enzimima KpnI/XhoI) su prikazani u Tabeli 8.

Tabela 8. Uslovi reakcije ligacije.

sastav i volumen smeše	temperaturni uslovi
pufer za ligazu (Promega)	sobna temperatura 1 h + 4 °C preko noći
pGEM-T Easy vektora (50 ng) (Promega)	
10 U T4 ligaza (Promega)	
100 ng inserta (prčišćen PCR)	
sterilna H ₂ O do 10 µL	
1 X T4 DNA Ligase pufer (Biolabs)	+ 16 °C preko noći
10 U T4 DNA Ligaza (Biolabs)	
50 ng pGL KpnI/XhoI	
300 ng pMMP9 KpnI/XhoI	
sterilna H ₂ O do 20 µL	

U ovom radu u reakciji ligacije korišćeni su fragmenti DNK dobijeni umnožavanjem promotora gena MMP9 u PCR reakciji i fragmenti dobijeni digestijom konstrukta pGEM-pMMP9 i pGL vektora koji su prečišćeni iz agaroznog gela.

3.3.10. Sekvenciranje DNK

Metodom sekvenciranja određuje se redosled nukleotida u molekulu DNK. Metoda se zasniva na sposobnosti DNK sekvencaze da sintetiše komplementaran lanac DNK nastavljajući oligonukleotidni lanac vezan za jednolančanu DNK (Sanger et al.

1977). Reakcija sinteze komplementarnog lanca se zaustavlja ugrađivanjem 2',3'-dideoksiribonukleotidtrifosfata (ddNTP) koji ne poseduje 3'-OH grupu na molekulu dezoksiriboze i nakon njihove ugradnje dolazi do terminacije elongacije. Kao produkt reakcije sekvenciranja dobijaju se fragmenti DNK čije se dužine razlikuju za po 1 nukleotid, a koji se završavaju jednim od obeleženih 2',3'-ddNTP. Svaki od 4 ddNTP obeležen je različitom fluorescentnom bojom čime je omogućena detekcija fragmenata.

Sekvenciranje DNK je vršeno kitom BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Sekvenciranje je vršeno prema uputstvu proizvođača. Sastavi smeša za sekvenciranje i temperaturni uslovi reakcija su prikazani u Tabeli 9.

Tabela 9. Uslovi reakcija sekvenciranja PCR produkata i plazmidnih vektora.

sekvencirani fragment	sastav i volumen smeše	temperaturni uslovi
CFTR egzon 3 i 10	3 μ L BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	96 °C 1'
	3,2 pmol prajmera	96 °C 10"
	3-20 ng DNK	50 °C 5" 25 ciklusa
	sterilna dH ₂ O do 8 μ L	60 °C 4'
pGEM-pMMP9 i pGL-pMMP9	3 μ L BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	96 °C 1'
	3,2 pmol prajmera	96 °C 10"
	150-300 ng DNK	50 °C 5" 25 ciklusa
	sterilna dH ₂ O do 8 μ L	60 °C 4'

CFTR-eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; MMP-eng. Matrix Metalloproteinase.

Produkti reakcije sekvenciranja su prečišćavani pre kapilarne elektroforeze na sledeći način:

- U 8 μ L smeše u kojoj je vršena reakcija sekvenciranja se dodaje 40 μ L 0,1 M Na-acetata pH 5,2 rastvorenog u etanolu i centrifugira se na 13000 obr/min 10 minuta.
- Talog se ispere sa 200 μ L 70% etanola dva puta, a nakon svakog pranja smeša se centrifugira na 13000 obr/min 10 minuta.
- Talog se suši nekoliko minuta na sobnoj temperaturi i zatim rastvori u 25 μ L Hi-Di Formamide (Applied Biosystems).

Produkti reakcije sekvenciranja se analiziraju kapilarnom elektroforezom na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) u komercijalnom polimeru

POP-7 Polymer (Applied Biosystems). Za analizu dobijenih sekvenci se koristi Sequencing Analysis Software v5.3.1 with KB Basecaller v1.4 (Applied Biosystems).

U ovom radu sekvencirani su egzoni 3 i 10 gena CFTR i inserti konstrukata pGEM-pMMP9 i pGL-pMMP9T. U reakciji sekvenciranja su korišćeni prečišćeni produkti PCR reakcije. Za sekvenciranje inserata u pGEM-pMMP9, pGL-pMMP9C i pGL-pMMP9T vektorima korišćena je izolovana plazmidna DNK. Oligonukleotidi koji su korišćeni za umnožavanje i/ili sekvenciranje CFTR gena i promotora MMP9 su prikazani u Tabeli 1.

3.3.11. *In situ* PCR dirigovana mutageneza

In situ PCR dirigovana mutageneza se koristi za uvođenje promena u DNK sekvenci cirkularnih vektora. Za svako mesto koje se mutira potreban je po jedan odgovarajući prajmer. Prajmeri koji se koriste u mutagenezi bi trebali da sadrže između 25-45 nukleotida i da temperatura njihovog topljenja bude ≥ 75 °C. Temperatura topljenja se može izračunati pomoću sledeće formule:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times (\text{GC}\%) - 675/N - \text{MN}\%; \text{GC-GC sastav } (\%), N\text{-dužina prajmera (bp), MN-nespareni nukleotidi } (\%)$$

Moguće je izvršiti simultanu mutagenezu na najviše 5 mesta u vektoru. Procedura dobijanja mutiranog plazmida se sastoji iz tri koraka (Stratagene).

Prvi korak obuhvata PCR reakciju u kojoj se vrši ekstenzija mutiranog prajmera pomoću *PfuTurbo* DNK polimeraze. Dobijaju se dvolančani molekuli DNK, a samo jedan lanac nosi mutacije i prekide koji se zatvaraju pomoću enzimske smeše. Sastav PCR smeše i uslovi umnožavanja su prikazani u Tabeli 10.

Tabele 10. Uslovi reakcije PCR mutageneze.

sastav i volumen smeše	temperaturni uslovi
1 X QuikChange Multi reaction buffer	95 °C 1'
0,75 μ L QuikSolution	
1 μ L dNTP	95 °C 1'
100 ng prajmera MMP9-1562T	55 °C 1' 30 ciklusa
50 ng pGL-pMMP9	65 °C 13'
1 μ L QuikChange Multi enzyme blend	
sterilna H ₂ O do 25 μ L	

Drugi korak mutageneze obuhvata digestiju produkta PCR reakcije endonukleazom *DpnI* koja seče metilovanu i hemimetilovanu DNK (5'Gm⁶ATC-3') i na taj način odstranjuje DNK lanac koji je korišćen kao matrica za mutagenezu. Uslovi reakcije su prikazani u Tabeli 11.

Tabela 11. Uklanjanje metilovane DNK.

fragment	sastav smeše	temperaturni uslov	produkt digestije
pGL-pMMP9 DNK	20 U <i>DpnI</i> (Biolabs) 25 μ L PCR reakcije	37 °C, 1 h	pGL-pMMP9 jednolančana cirkularna nemetilovana DNK

Treći korak obuhvata transformaciju ultrakompetentnih XL 10-Gold ćelija (Stratagene) sa mutiranom zatvorenom jednolančanom DNK koja se *in vivo* prevodi u dvolančanu DNK. Transformacija obuhvata sledeće korake:

- Kompetentne XL 10-Gold ćelije se otope na ledu. U 45 μ L kompetentnih ćelija doda se 2 μ L β merkaptioetanol. Smeša se blago promeša i inkubira na ledu 10 minuta uz povremeno lagano mešanje.
- U smešu se doda 1,5 μ L produkata digestije enzima *DpnI*. Transformaciona smeša se lagano promeša i inkubira na ledu 30 minuta.
- Transformaciona smeša se izlaže temperaturnom šoku od 42 °C 30 sekundi, a zatim inkubira na ledu dva minuta.
- Transformisanim ćelijama se doda 500 μ l tečnog NZY⁺ medijuma, prethodno temperiranog na 42 °C, i kultura se inkubira na 37 °C pri 225 obr/min u trajanju od 60 minuta.
- Nakon toga se tečna bakterijska kultura utrlja na čvrstu LB podlogu sa ampicilinom.

U ovom radu je za dobijanje mutirane varijante pGL-pMMP9 vektora, koji umesto wt (eng. Wild Type) sekvence promotora nosi mutaciju -1562T korišćen kit QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis.

3.3.12. Kultivisanje bakterija

Rad sa bakterijama se izvodi u sterilnim uslovima (Maniatis et al. 1989). Bakterije *E. coli* soja DH5 α i XL 10-Gold gaje se u tečnom LB medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca), NZY* medijumu (1% NZ amin (hidrolizat kazeina), 0,5% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca, pH 7,5, u koji se neposredno pre korišćenja dodaje 12,5 mL 1M MgCl₂, 12,5 mL 1M MgSO₄ i 20 mL 20% glukoze na 1000 mL medijuma) ili na čvrstoj LA podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca i 1,5% bacto-agar). Medijumi za kultivisanje bakterija se sterilišu autoklaviranjem 20 minuta na 121 °C.

Bakterije se kultivišu na temperaturi od 37 °C. Kako bi se vršila selekcija odgovarajućeg klona u medijum se dodaje odgovarajući antibiotik. Vektori pGEM-T Easy i pGL obezbeđuju rezistenciju na ampicilin, te je ovaj antibiotik dodavan u finalnoj koncentraciji od 100 µg/ml u tečni i čvrsti medijum. Za plavo-belu selekciju klona sa insertom u čvrstu podlogu su pored ampicilina dodavani 500 µM IPTG (Izopropil-D-1-tiogalaktopiranozid) i 80 µg/mL X-Gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil- β -D-galactopiranozid).

3.3.12.1. Priprema kompetentnih ćelija *E. coli*

Metoda ima za cilj pripremanje bakterija da prime strane DNK molekule, tj. da budu transformisane (Maniatis et al. 1989). To se postiže tretmanom bakterijskih ćelija u puferima koji povećavaju propustljivost bakterijske membrane, a pri tome omogućavaju očuvanje vijabilnosti samih ćelija. Procedura obuhvata sledeće korake:

- Sa čvrste podloge inokuliše se nekoliko pojedinačnih kolonija u 10 mL medijuma LB i kultiviše preko noći na 180 obr/min na 37 °C.
- Sa 2 mL prekončne kulture inokuliše se 200 mL LB medijuma. Kultura se gaji na 37 °C na 180 obr/min do dostizanja optičke gustine, OD (eng. Optical Density) od 0,3-0,5 OD/ml koja se meri spektrofotometrom na talasnoj dužini od 600 nm.
- Kultura se zatim centrifugira (Sorvall centrifuga, rotor GSA) na 2500 obr/min, 10 minuta na 4 °C.

- Čelijski talog se resuspenduje u 10 mL 0,1 M CaCl₂ i inkubira na ledu 15 minuta, a zatim centrifugira 10 minuta na 4 °C i 2500 obr/min.
- Talog se resuspenduje u 2 mL hladnog RF2 rastvora (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% glicerol) i inkubira na ledu 15 minuta. Po 200 µL smeše se alikvotira hladnim nastavcima u hladne ependorf epruvete na ledu a zatim trenutno zamrzava u tečnom azotu. Kompetentne ćelije se do upotrebe čuvaju na -80 °C.

3.3.12.2. Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija

Zahvaljujući činjenici da bakterije podjednako efikasno replikuju plazmidnu kao i genomsku DNK, primenom ove metode obezbeđuje se dovoljna količina plazmidne DNK potrebne u eksperimentalnom radu. Metoda transformacije bakterija toplotnim šokom obuhvata sledeće korake (Maniatis et al. 1989):

- Kompetentnim ćelijama se doda 10 µL ligacione smeše, smeša se blago promeša i inkubira jedan sat na ledu.
- Smeša se zatim izlaže temperaturnom šoku, 2 minuta na 42 °C, a zatim inkubira na ledu 5 minuta.
- Transformisanim ćelijama se doda 400 µl tečnog LB medijuma bez antibiotika i kultura se inkubira na 37 °C pri 180 obr/min u trajanju od jednog sata.
- Nakon toga tečna bakterijska kultura se utrlja na čvrstu selektivnu LB podlogu.

U ovom radu za transformaciju kompetentnih ćelija *E. coli* soja DH5α korišćeni su konstrukti pGEM-pMMP, pGL-pMMP9C i pGL-pMMP9T.

3.3.12.3. Čuvanje transformanata

Dobijeni transformanti su vijabilni na čvrstim LB podlogama nekoliko nedelja, dok su za duže čuvanje pripremani i zamrzavani glicerolski stokovi (Maniatis et al. 1989). U ependorf epruvetu sa 150 µl sterilnog glicerola dodavano je po 850 µl

tečne prekonoćne bakterijske kulture i smeša je zamrzavana u tečnom azotu. Glicerolski stokovi koji se čuvaju na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ su vijabilni nekoliko godina.

3.3.13. Kultura ćelija

U937 (ATCC br. CRL-1593.2) je permanentna humana monocitna leukemična ćelijska linija (Ralph et al. 1976). Ćelije imaju okrugao do poligonalni oblik, rastu u suspenziji kao pojedinačne ćelije a mogu formirati i grozdove.

Rad sa ćelijama odvija se u sterilnoj sobi uz korišćenje sterilne laminarne komore i uz sve propisane mere sterilnog rada. Ćelije se gaje u inkubatoru sa automatskim protokom $5\% \text{ CO}_2$ na temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za održavanje ćelijske kulture U937 koristi se medijum koji se sastoji od 90% RPMI, 10% FCS (eng. Fetal Calf Serum), 100 U/mL penicilina i $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ streptomicina. RPMI 1640 (GlutaMAX, Invitrogen) sadrži 2 mM L-glutamin i 25 mM HEPES.

Ćelije treba brzo odmrznuti, prenoseći ih sa $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ u kompletni medijum koji je temperiran na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zasejavanje ćelija vršeno je na sledeći način:

- Alikvot ćelija se naglo otopi, ćelije se dodaju u epruvetu sa $5\text{-}10\text{ mL}$ kompletnog medijuma, centrifugiraju (klinička centrifuga, SANYO) na 1200 obr/min 4 minuta.
- Ćelije se resuspenduju u svežem medijumu, zasade u flask i prenesu u inkubator.

Ćelije se u kulturi održavaju na gustini od 2×10^5 do 2×10^6 ćelija/mL. Ćelije se peru u fosfatnom puferu (PBS) (137 mM NaCl , $3,7\text{ mM KCl}$, $1,8\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $10,1\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$). Vreme udvostručavanja broja ćelija u kulturi iznosi ~ 20 sati, a pasažiranje se vrši svakih $2\text{-}4$ dana. U svim eksperimentima korišćene su ćelije od $3.$ do $10.$ pasaža. Ćelije se pasažiraju tako što se stari medijum kompletno zameni novim:

- Ćelije se najpre resuspenduju u flasku u kome su rasle, kako bi se razbili grozdovi, a zatim prebace u epruvetu i stalože na 1200 obr/min 4 minuta. Jedan deo ćelijske suspenzije se izdvoji radi određivanja broja ćelija.

- Čelijski talog se zatim resuspenduje u potpunom medijumu koji je prethodno temperiran na 37 °C u koncentraciji od 2×10^5 ćelija/ml.

Ćelije se broje uz pomoć Neubauer-ove pločice za brojanje koja ima 4 velika polja, svako sa 16 (4 X 4) manjih polja, a gustina ćelija se računa po sledećoj formuli:

$$\text{broj ćelija/ml} = \text{broj ćelija} / 4 \times 10^4.$$

Indukcija diferencijacije monocita U937 u makrofage vršena je sa PMA (Pierce et al. 1996). Nakon indukcije sa PMA ćelije prestaju da rastu u suspenziji, padaju na dno suda i lepe se. Indukcija je uključila sledeće korake:

- Jedan dan pre indukcije ćelije se zasade u svež, kompletan medijum, pri gustini od $4 - 6 \times 10^5$ ćelija/ml.
- Narednog dana ćelije se sakupe u epruvetu, stalože i operu u 10 mL PBS. Ćelije se zatim resuspenduju u RPMI medijumu sa antibioticima (bez seruma), prebroje, i nakon dodavanja 50 ng/mL PMA, zasadi se 2×10^6 ćelija u 1800 μ L medijuma u "6-well plate" (za real-time PCR analizu i želatinski zimogram), i 1×10^5 ćelija u 90 μ L medijuma u "96-well plate" (za MTT test).

Ćelije indukovane sa PMA korišćene su za analizu ekspresije MMP9 metodom real-time PCR, metodom želatinskog zimograma i određivanje ćelijske vijabilnosti bojenjem tripan plavim i MTT testom. Nakon indukcije sa PMA ćelije su tretirane ekstraktom duvanskog dima.

Ćelije se zamrzavaju u medijumu za zamrzavanje (85% RPMI, 10% FCS i 5% DMSO). DMSO u medijumu za zamrzavanje ima krioprotektivnu ulogu jer obezbeđuje vezivanje vode i time smanjuje verovatnoću stvaranja kristala leda koji mogu da oštete ćelije. Pored toga, ćelijska suspenzija se mora zamrzavati postepeno, jer se tada preferencijalno stvaraju ekstracelularni u odnosu na intracelularne kristale, pa ćelije ostaju neoštećene. Zamrzavanje se vrši na sledeći način:

- Nakon brojanja, ćelije se stalože centrifugiranjem na 1200 obr/min 4 minuta, i resuspenduju u medijumu za zamrzavanje, tako da im gustina bude 5×10^6 ćelija/mL. Zamrzavaju se alikvoti od 1 mL.

- Čelije se najpre zamrznu na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4 do 8 sati), a zatim na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (16 do 24 sata). Nakon toga čelije se smeste u tečni azot ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Noj toj temperaturi hemijske i fizičke aktivnosti u ćeliji su na zanemarljivom nivou i one ostaju vijabilne godinama.

3.3.14. Tranzijentna transfekcija ćelija u suspenziji

Transfekcija predstavlja proces uvođenja nukleinskih kiselina u eukariotsku ćeliju nevirusnom metodom. Reporterski eseji zajedno sa transfekcijom predstavljaju klasičan pristup proučavanja promotora gena na funkcionalnom nivou (Groskreutz et al. 1997). Transfekcija je proces koji podrazumeva neutralizaciju negativno naelektrisanih molekula DNK i RNK koji se uvode u ćeliju kroz negativno naelektrisanu membranu. Hemikalije poput kalcijum-fosfata i DEAE-dextrana ili katjonski lipidi, obavijaju molekul DNK, neutrališu ga ili mu daju pozitivno naelektrisanje, što omogućava lakši transfer kompleksa kroz membranu, naročito u slučaju lipida koji imaju fuzogena svojstva. Fizički pristupi poput mikroinjekcije ili elektroporacije jednostavno probiju membranu uvodeći DNK molekul direktno u citoplazmu.

Eksperimenti tranzijentnih transfekcija U937 ćelija vršeni su reagensom SuperFect Transfection Reagent (Qiagen). Ovaj reagens spada u grupu aktiviranih dendrimera definisane sferne arhitekture, sa granama koje se radijalno šire od centra i završavaju naelektrisanim amino grupama. Superfekt sakuplja DNK u kompaktnu strukturu, tako da formira kompleks koji ima ukupno pozitivno naelektrisanje, čime je omogućeno vezivanje za negativno naelektrisane receptore na površini ćelije. Nakon što uđe u ćeliju kompleks fuzioniše sa endozomima, a nakon fuzije sa lizozomima dovodi do inhibicije lizozomalnih nukleaza promenom pH, čime je kompleks DNK–superfekt dodatno stabilizovan.

Transfekcije su vršene prema uputstvu proizvođača (Qiagen) za tranzijentne transfekcije ćelija u suspenziji:

- Jedan dan pre transfekcije ćelije se zasade u svež, kompletan medijum, pri gustini od $4 - 6 \times 10^5$ ćelija/ml.

- Narednog dana ćelije se sakupe u epruvetu, stalože i operu u 10 mL pufera PBS. Ćelije se zatim resuspenduju u potpunom medijumu i prebroje. Zasadi se 1×10^6 ćelija u 800 μ L medijuma u "12-well-plate".
- DNK se rastvori u RPMI medijumu (bez seruma i antibiotika), meša na vorteksu i staloži centrifugiranjem. Pripremaju se dve smeše, jedna sadrži pGL-pMMP9C, a druga pGL-pMMP9T plazmidnu DNK. Rastvara se po 1,5 μ g pGL-pMMP9C ili pGL-pMMP9T vektora i 100 ili 500 ng pRL-TK vektora u 70 μ L RPMI medijuma po uzorku.
- U rastvorenu DNK se zatim dodaje 4 μ L Superfect, smeša se vorteksuje 10 sekundi, i inkubira na sobnoj temperaturi 5-10 minuta.
- Smeši se zatim dodaje 100 μ L potpunog medijuma, promeša se pipetom dva puta i nakapa na ćelije.
- Ćelije se naredna 24 sata gaje u standardnim uslovima.

U ovom radu ćelije U937 su tranzijentno transfekovane vektorima: pGL-pMMP9C, pGL-pMMP9T i pRL-TK.

3.3.15. Tretman ćelija ekstraktom duvanskog dima

Ćelije U937, indukovane PMA i transfekovane, tretirane su ekstraktom duvanskog dima (Murty Pharmaceuticals). Tretman i indukcija ćelija vršeni su tokom zasejavanja ćelija, dok su transfekovane ćelije tretirane 3 sata nakon transfekcije. Tretman je vršen na sledeći način:

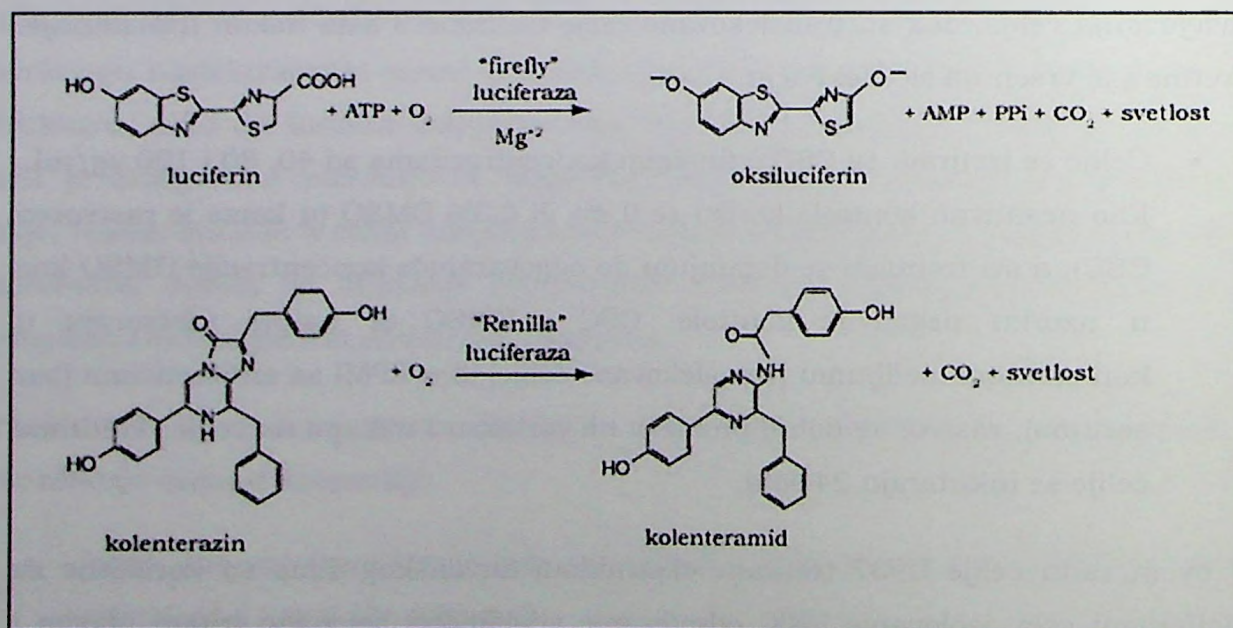
- Ćelije se tretiraju sa CSC u finalnim koncentracijama od 40, 80 i 120 μ g/mL. Kao negativna kontrola koristi se 0,2% ili 0,3% DMSO (u kome je rastvoren CSC), a svi tretmani se dopunjuju do odgovarajuće koncentracije DMSO kao u uzorku negativne kontrole. CSC i DMSO se najpre rastvaraju u potpunom medijumu (transfekovane ćelije) ili u RPMI sa antibioticima (bez seruma), rastvor se dobro promeša na vorteksu i nakapa na ćelije. Tretirane ćelije se inkubiraju 24 sata.

U ovom radu ćelije U937 tretirane ekstraktom duvanskog dima su korišćene za luciferazni esej, izolovanje RNK, određivanje vijabilnosti bojenjem tripan plavim i MTT testom, dok je medijum u kome su ćelije gajene korišćen za analizu na želatinskom zimogramu.

3.3.16. Luciferazni esej

Genetički reporter sistemi, u koje spada luciferazni reporter sistem, se koriste za proučavanje ekspresije eukariotskih gena i ćelijske fiziologije. Luciferazni esej omogućava simultanu ekspresiju dva vektora sa dva različita reporter gena, a merenje aktivnosti dva individualna reporter enzima se odvija u jednoj reakciji. Ekspresija eksperimentalnog reporter gena zavisi od eksperimentalnih uslova i određuje se merenjem aktivnosti "firefly" luciferaze (*Photinus pyralis*). Ekspresija kotransfekovanog kontrolnog reporter gena obezbeđuje internu kontrolu i određuje se merenjem aktivnosti "Renilla" luciferaze (*Renilla reniformis*). Ekspresija eksperimentalnog reportera se normalizuje prema kontrolnom reporteru čime se smanjuje eksperimentalna varijabilnost usled različite efikasnosti transfekcije.

U ovom eseju aktivnost "firefly" i "Renilla" luciferaza u liziranim ćelijama se meri sukcesivno u jednoj reakciji. Najpre se vrši merenje aktivnosti "firefly" luciferaze dodavanjem reagensa koji sadrži luciferin, koji se prevodi u oksiluciferin uz oslobađanje svetlosti koju detektuje aparat luminometar. Nakon kvantifikacije luminescencije koja potiče od "firefly" luciferaze, dodaje se reagens koji gasi ovu reakciju i sadrži kolenterazin koji luciferaza "Renilla" prevodi u kolenteramid uz oslobađanje svetlosti. Supstrati i odgovarajuće enzimske reakcije su prikazani na Slici 12.



Slika 12. Reakcije "firefly" i "Renilla" luciferaza sa odgovarajućim supstratima koje dovode do luminescencije. Preuzeto sa www.promega.com.

Merenje luciferaznih aktivnosti vršeno je na aparatu GloMax 20/20 Luminometer (Promega), nakon liziranja ćelija u puferu PLB (eng. Passive Lysis Buffer) (Promega), prema uputstvu proizvođača. Procedura obuhvata sledeće korake:

- Ćelije se 24 sata nakon transfekcije resuspenduju i talože centrifugiranjem na 2000 obr/min 4 minuta.
- Ćelijski talog se zatim pere u kompletnom puferu PBS (137 mM NaCl, 3,7 mM KCl, 1,8 mM KH_2PO_4 , 10,1 mM Na_2HPO_4 , 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2) i centrifugira na 2000 obr/min 4 minuta.
- Ćelijski talog se resuspenduje u 100 μL pufera PLB i inkubira na ledu 30 minuta.
- Ćelijski lizat se zatim centrifugira na 13000 obr/min 30 sekundi i izdvoji se 10 μL supernatanta za merenje aktivnosti luciferaza.
- Najpre se dodaje 50 μL reagensa LAR (eng. Luciferase Assay Reagent) II (Promega) pomoću koga se kvantifikuje luminescencija poreklom od "firefly" luciferaze. Zatim se dodaje Stop&Glo Reagent (Promega) koji gasi prethodnu reakciju i produkuje stabilanu luminescenciju poreklom od "Renilla" luciferaze. Reagenasi se dodaju automatski, luminescencije se mere u intervalu od 10 sekundi, a izmerene vrednosti se očitavaju na ekranu aparata.

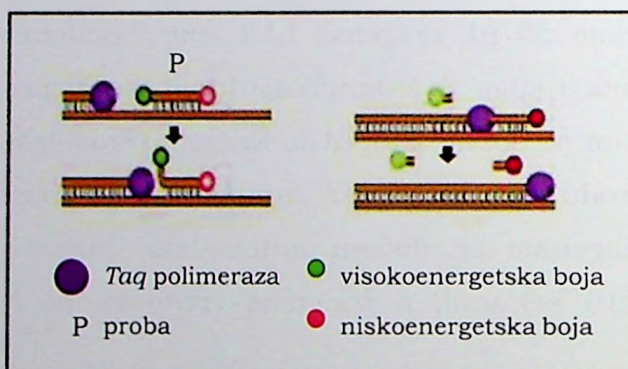
U ovom radu luciferazni esej vršen je na U937 ćelijama transfekovanim sa pGL-pMMP9C ili pGL-pMMP9T vektorom i tretiranim ekstraktom duvanskog dima.

3.3.17. Real-time PCR metoda

Real-time PCR omogućava praćenje akumulacije DNK produkta tokom PCR reakcije. Ovo je najsenzitivnija i najpouzdanija metoda za kvantifikaciju nukleinskih kiselina, koja se bazira na detekciji fluorescentnog signala. Detekcija produkata PCR reakcije omogućena je korišćenjem oligonukleotidnih TaqMan proba koje su obeležene fluorescentnom bojom i komplementarne delu sekvence koja se umnožava. Na svom 5' kraju proba je obeležena viskoenergetskom bojom tj. reporterom, dok na 3' kraju ima niskoenergetsku boju, tj. utišavač (Slika 13).

Proba je komplementarna sa delom sekvence koji se umnožava u PCR reakciji smeštenom između uzvodnog i nizvodnog prajmera. Kada se tokom amplifikacije

proba nađe na putu *Taq* polimeraze biva degradovana njenom 5' egzonukleaznom aktivnošću, utišavač prestaje da apsorbuje signal reportera i dolazi do emisije signala. Na taj način se signal detektuje samo pri specifičnom umnožavanju. U početnim ciklusim PCR reakcije signal se ne može detektovati, čime se definiše osnovni nivo signala amplifikacione krive. Tačka u kojoj intenzitet signala PCR reakcije doseže intenzitet fluorescentnog signala iznad baznog nivoa označen je kao "treshold" i definisan je parametrom Ct. Parametar Ct se definiše kao deo ciklusa u kome uzorak dostiže nivo "treshold"-a. U ovom radu korišćen je pristup relativne kvantifikacije ili $\Delta\Delta Ct$ metoda. Rezultati se najpre normalizuju u odnosu na vrednost dobijenu za endogenu kontrolu, a zatim se iskazuju u odnosu na kalibrator kome se dodeljuje vrednost 1.



Slika 13. Real-time PCR baziran na TaqMan hemiji. Preuzeto sa www.appliedbiosystems.com

Reakcija real-time PCR vršena je na aparatu 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Za kvantifikaciju ekspresije gena za MMP9, korišćeni su TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) prajmeri i probe za MMP9 (Hs00957562 m1) i endogenu kontrolu GAPDH (gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza)(4310884E).

Reakcije su sastavljane prema uputstvu za TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Uslovi pri kojima je vršena real-time PCR reakcija su prikazani u Tabeli 12.

Za obradu dobijenih rezultata korišćen je 7500 System Software (Applied Biosystems).

U ovom radu metoda real-time PCR je korišćena za analizu ekspresije MMP9 u indukovanim U937 ćelijama tretiranim ekstraktom duvanskog dima.

Tabela 12. Uslovi real-time PCR reakcije.

sastav i volumen smeše	temperaturni uslovi
1 X Univerzalni PCR MasterMix	50 °C 2'
1 X GAPDH prajmeri + proba (VIC/TAMRA)	
1 X MMP9 prajmeri + proba (FAM/MGB)	95 °C 10'
3 µL cDNK	95 °C 15" 40 ciklusa
H ₂ O do 20 µL	60 °C 1'

VIC, FAM-boja na 5' kraju probe; TAMRA, MGB-utišavač na 3' kraju probe.

3.3.18. Metoda želatinskog zimograma

Zimografija predstavlja jednostavnu, senzitivnu, kvantitativnu i funkcionalnu metodu za analizu proteolitičke aktivnosti (Heussen et al. 1980). Takođe, veoma često se koristi za proučavanje enzima uključenih u ekstracelularnu degradaciju matriksa, kao što su MMP.

Standardna metoda se zasniva na elektroforetskom razdvajanju proteina na SDS (eng. Sodium Dodecyl Sulfate) poliakrilamidnom gelu kopolimerisanom sa proteiskim supstratom koji služi za detekciju enzimske aktivnosti. Nakon elektroforeze iz gela se uklanja SDS i gel se inkubira u odgovarajućem pufer koji omogućava proteolitičku aktivnost enzima prema kopolimerisanom supstratu. MMP2 i MMP9 se detektuju pomoću želatinskog zimograma, a MMP7 na kazeinskim gelovima. Nakon bojenja gela Komasi plavim mesta na kojima je ostvarena proteoliza se uočavaju kao bele trake na plavoj pozadini.

Pripremanje kondicioniranog medijuma vršeno je na sledeći način:

- Čelije koje su indukovane sa PMA i tretirane sa CSC se sastružu sa podloge, resuspenduju i prebace u epruvetu.
- Suspenzija se centrifugira na 2000 rpm 5 minuta. Supernatant (kondicionirani medijum) se izdvoji, brzo smrzne u tečnom azotu i odloži na -80 °C do analize na zimogramu.

U ovom radu metoda želatinskog zimograma je korišćena za analizu aktivnosti enzima MMP9 u uzorcima kondicioniranih medijuma u kojima su gajene čelije U937 indukovane PMA i tretirane CSC.

3.3.18.1. Seminativna elektroforeza proteina

Elektroforeza na SDS gelu od poliakrilamida, SDS-PAGE (eng. Polyacrylamide Gel Electrophoresis) je metoda koja omogućava razdvajanje proteina na osnovu njihove mase. SDS obezbeđuje denaturaciju proteina i njihovu uniformnu naelektrisanost (Toth et al. 2001).

Denurišući SDS poliakrilamidni gel sastoji se iz gela za koncentrovanje (stacking gel) koji omogućava homogenizaciju uzoraka i gela za razdvajanje (running gel) u kome se proteini iz uzorka razdvajaju prema masi.

Želatin u gelu omogućava praćenje proteolitičke aktivnosti enzima MMP9.

Gel za razdvajanje je sledećeg sastava: 7,5% poliakrilamid (akrilamid:N,N'-metilenbisakrilamid u odnosu 29:1), 375 mM Tris pH 8,8 i 0,1% SDS, 0,1% APS i 0,01% TEMED, a gel za koncentrovanje se sastoji od: 6% poliakrilamida (akrilamid:N,N'-metilenbisakrilamid u odnosu 29:1), 0,5 M Tris HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS i 0,01% TEMED. U gel za razdvajanje dodaje se 0,2% želatin. Kondicionirani medijum meša se sa puferom za uzorak u odnosu 4:1 (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 8,75% glicerol, 0,1% bromfenol plavo) u neredukujućim uslovima i inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta. Uzorci se zatim nanose na gel. Elektroforeza se odvija u Tris-glicinskom (TG) puferu (25 mM Tris pH 8,8, 250 mM glicin, 0,1% SDS), pri konstantnom naponu od 100 V u gelu za koncentrovanje i 150 V u gelu za razdvajanje na +4 °C u trajanju od 3 sata.

Nakon elektroforeze vršeno je razvijanje želatinskog zimograma.

3.3.18.2. Razvijanje želatinskog zimograma

Po završetku elektroforeze gel je inkubiran u puferu za renaturaciju i razvijanje sledećim postupkom (Souza-Tarla et al. 2005):

- Gel se najpre inkubira u puferu za renaturaciju koji sadrži 2,5% Triton X-100, na sobnoj temperaturi uz mućkanje na 30 obr/min 1,5 sat.
- Nakon toga gel se inkubira u puferu za razvijanje koji se sastoji iz: 2,5 mM Tris-HCl pH 7,5 i 0,5 mM CaCl₂, na 37 °C, na 30 obr/min 18 sati.

Nakon razvijanja zimograma gel se boji Komasi plavom bojom.

3.3.18.3. Bojenje proteina u gelu

Gel sa želatinskim zimogramom je bojen bojom Komasi brilijant plavom (Coomassie Brilliant Blue) (Menshikov et al. 2006) sledećim postupkom:

- Gel se boji u 0,25% rastvoru boje Komasi brilijant plavo G 250, 40% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini, na sobnoj temperaturi, uz blago mućkanje 30 minuta.
- Odbojavanje se vrši u odbojivaču sastava: 40% metanol i 10% sirćetna kiselina, na sobnoj temperaturi, uz blago mućkanje. Odbojivač se menja do dobijanja zadovoljavajućeg kontrasta.

Nakon toga, gel je skeniran, a kvantifikacija aktivnosti MMP9 vršena je programom Image J.

3.3.19. Određivanje vijabilnosti ćelija

3.3.19.1. Određivanje broja živih ćelija bojenjem tripan plavim

Određivanje broja živih ćelija bojenjem tripan plavim bazira se na činjenici da žive ćelije imaju intaktnu membranu koja ne propušta boju, dok membrana mrtvih ćelija propušta boju.

- Suspenzija ćelija se meša sa tripan plavim (rastvorenim u PBS), u finalnoj koncentraciji od 0,08%, inkubira se nekoliko minuta i nanosi na hemocitometar radi prebrojavanja ćelija. Žive ćelije imaju svetlu, a mrtve plavu citoplazmu.

Određivanje broja živih ćelija bojenjem tripan plavim vršeno je na ćelijama U937 koje su indukovane PMA i tretirane sa CSC.

3.3.19.2. MTT test

MTT test je kolorimetrijski esej u kome se detektuje redukcija žute tetrazolijumske soli dimetiltiazol-difeniltetrazolijum-bromida (MTT) u ljubičasti formazan koju vrše mitohondrijalne reduktaze živih ćelija. Do redukcije dolazi samo ukoliko su mitohondrijalne reduktaze aktivne, i stoga je ova konverzija direktno proporcionalna broju živih ćelija. Kristali formazana se rastvaraju dodavanjem DMSO, a bojena reakcija se kvantifikuje merenjem apsorbance na spektrofotometru.

MTT test se izvodi na sledeći način (Upadhyaya et al. 2007):

- Ćelijama se doda po 20 μ L MTT (5 mg/mL), blago se resuspenduju i vrate u inkubator još 4 sata.
- Nakon inkubacije ćelijama se doda 100 μ L DMSO i meri se apsorbance na 620 nm na čitaču za mikroploče Microplate reader Multiskan RC (Labsystems).

U ovom radu MTT test je vršen na ćelijama U937 koje su indukovane PMA i tretirane CSC.

3.3.20. Statistička obrada podataka

Podaci o starosti, kumulativnom efektu pušenja (izraženom u paklo godinama) i plućnoj funkciji prikazani su kao srednja vrednost \pm standardna greška srednje vrednosti, SEM (eng. Standard Error of Mean). Odstupanje distribucija genotipova od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže, procenjeno je χ^2 testom za grupu pacijenata i kontrolne grupe. Distribucija alelskih varijanti, pojedinačnih i složenih genskih varijanti između pacijenata i kontrolne grupe analizirana je Fišerovim egzaktnim testom. Grupa pacijenata je poređena sa kontrolnom grupom K (koju čini 50 pušača i 50 nepušača) i sa kontrolnom grupom PK (50 pušača). Takođe su određeni OR i 95%CI (eng. Odds Ratio and Confidence Interval). Analizirana je modulatorna uloga ispitivanih genskih varijanti u zavisnosti od stadijuma bolesti i životne dobi kada je bolest nastupila. Uloga genskih varijanti u težini bolesti ispitivana je poređenjem podgrupa pacijenata sa graničnim $FEV_1 \geq 50$ (GOLD 2006).

Uloga genskih varijanti u starosnoj dobi kada je bolest nastupila, ispitivana je poređenjem podgrupa pacijenata sa graničnom starošću ≥ 40 godina.

Rezultati luciferaznog eseja, želatinozne aktivnosti enzima MMP9, broja živih ćelija određenih tripan plavim i ćelijske vijabilnosti merene MTT testom su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM.

Za p vrednost manju od 0,05 rezultat je smatran statistički značajnim. Statistička analiza je vršena pomoću statističkih paketa R (GNU software) i SPSS (eng. Statistical Package for Social Sciences) verzija 10.

Rezultati kvantifikacije ekspresije gena MMP9 su prikazani kao srednja vrednost sa maksimumom i minimumom i analizirani su 7500 System Software-om.

4. Rezultati

4.1. Ispitanici

Ova studija je uključila 86 pacijenata obolelih od hronične opstruktivne bolesti pluća. Među obolelima, 31 pacijent je imao plućni emfizem, a 55 pacijenata hronični bronhitis kao dominantne simptome. Svi pacijenti oboleli od HOBP su imali: $(FEV_1)/(FVC) < 70\%$, postbronhodilatatorni $FEV_1 < 80\%$ od predviđene vrednosti, reverzibilnost $< 12\%$ nakon primene kratkododelujućeg β_2 agonista i 200 mL prebronhodilatatora.

Kontrolnu grupu je činilo 100 ispitanika kod kojih je prisustvo HOBP isključeno. Parametri plućne funkcije svih kontrolnih ispitanika su pokazali normalne vrednosti: $(FEV_1)/(FVC) > 70\%$ i $FEV_1 > 80\%$ od predviđene vrednosti. Kontrolni ispitanici su svrstani u dve kontrolne grupe označene kao K i PK. Kontrolna grupa K je uključila 100 ispitanika, 50 pušača i 50 nepušača, a kontrolna grupa PK je uključila 50 pušača.

Osnovne karakteristike i klinički parametri obolelih od HOBP i kontrolnih grupa K i PK prikazane su u Tabeli 13. Starost, kumulativno dejstvo duvanskog dima, FEV_1 i FEV_1/FVC su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM, dok su pol i pušački status izraženi kao procentualne vrednosti. Kumulativno dejstvo duvanskog dima je izraženo u paklo-godinama koje su preračunate tako što je broj popušanih cigareta na dan, izražen u paklama cigareta, pomnožen sa brojem godina koliko subjekt puši. Distribucija muškog pola, srednjih godina i kumulativnog dejstva duvanskog dima je bila značajno povišena u grupi obolelih u odnosu na kontrolnu grupu K ($p < 0,01$).

Tabela 13. Osnovne karakteristike ispitanika obolelih od HOBP i subjekata kontrolnih grupa.

	HOBP	K	PK
ispitanici, n	86	100	50
starost, godine	59,9 \pm 1,6	50,9 \pm 1,4	46,6 \pm 1,7
pol, muški (%)	67,4	35,0	44,0
pušački status, pušači (%)	72,1	50,0	100,0
kumulativno dejstvo duvanskog dima, (paklo-godine)	35,3 \pm 1,9	26,3 \pm 2,3	26,3 \pm 2,3
FEV_1 (% od predviđene vrednosti)	44,9 \pm 2,3	110,1 \pm 1,7	112,7 \pm 2,0
FEV_1/FVC	48,6 \pm 2,0	81,9 \pm 0,8	82,3 \pm 0,9

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; K-kontrolna grupa; PK-pušačka kontrolna grupa; FEV_1 -forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi; FVC-eng. Forced Vital Capacity.

4.2. Analiza funkcionalnih genskih varijanti

Iz uzoraka periferne krvi obolelih od HOBP i kontrolnih ispitanika izolovana je DNK koja je korišćena u analizi funkcionalnih genskih varijanti. Prinos i kvalitet izolovane DNK je proveren na 1% agaroznim gelovima. DNK je dalje korišćena za umnožavanje u PCR reakciji.

U ovom radu analizirane su funkcionalne genske varijante gena koji su uključeni u ravnotežu oksidanti-antioksidanti (CYP1A1 *1A/*2A, CYP2E1 *1A/*5B, GSTM1 -/-, GSTT1 -/-, GSTP1 Ile105Val, mEPHX S i F), ravnotežu proteinaze-antiproteinaze (MMP1 G-1607GG, MMP9 C-1562T, MMP12 A-82G, α_1 AT PI Z i PI S), inflamaciju (TNF α G-308A) i mukocilijarni klirens (CFTR 5T, M470V i egzoni 3, 10 i 11 gena CFTR) kod obolelih od HOBP i kontrolnih ispitanika.

Prilikom analize gena CFTR najpre su analizirani genska varijanta M470V i mutacija F508del, a nakon toga je vršen skrining egzona 10 metodom DGGE.

Za umnožavanje analiziranih genskih varijanti korišćeni su prajmeri prikazani u Tabeli 1, a uslovi umnožavanja željenih DNK fragmenata su prikazani u Tabeli 5. Prinos PCR reakcija je proveravan na 2% agaroznim gelovima.

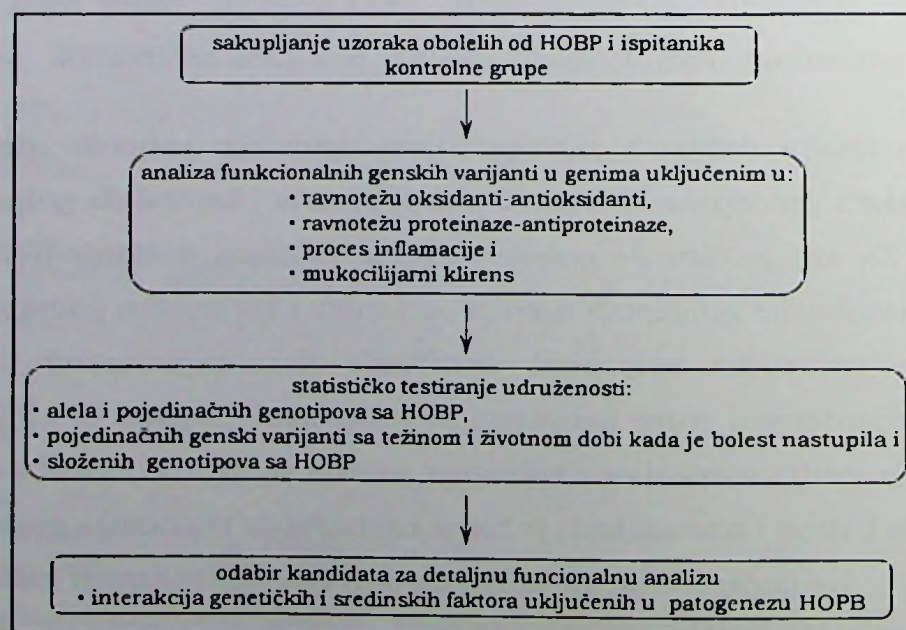
Analiza varijanti u genima GSTM1, GSTT1 i MMP1 kao i skrining egzona 3, 10 i 11 gena CFTR vršeni su elektroforetskom analizom produkata PCR reakcija (Tabela 14). Ostale genske varijante su detektovane nakon digestije odgovarajućim restrikcionim enzimima, prema uslovima prikazanim u Tabeli 5, a produkti digestije su analizirani elektroforezom kao što je prikazano u Tabeli 14.

Obradom podataka dobijenih genotipizacijom ispitivanih varijanti određene su njihove alelske i genotipske učestalosti kod pacijenata i kontrolnih grupa za našu populaciju. Za sve analizirane genske varijante testirana je Hardy-Weinberg-ova ravnoteža distribucije genotipova u grupi pacijenata i kontrolnim grupama K i PK. Testirana je statistička značajnost distribucija alela, pojedinačnih i složenih genotipova poređenjem grupe pacijenata sa kontrolnim grupama K i PK. Takođe, analizirana je modulatorna uloga ispitivanih genskih varijanti u HOBP u zavisnosti od stadijuma bolesti i starosti kada je bolest nastupila. Iz tog razloga grupa obolelih je podeljena u dve podgrupe prema kriterijumu za FEV₁ \geq 50 i starosti kada je bolest nastupila \geq 40 godina. Među ovim podgrupama pacijenata testirana je statistička značajnost u distribuciji pojedinačnih genotipova.

Tabela 14. Metode za detekciju genskih varijanti analiziranih gena.

gen (genska varijanta)	fragment, bp	restrikcioni enzim	produkti digestije, bp	metoda za detekciju
CYP1A1 (*A1/*2A)	339	<i>MspI</i>	CYP1A1*1A alel: 339 CYP1A1*2A alel: 205 + 134	2% agarozna GE
CYP2E1 (*1A/*5B)	410	<i>PstI</i>	CYP2E1*1A alel: 410 CYP2E1*5B alel: 290 + 120	2% agarozna GE
CYP2E1 (*1A/*5B)	410	<i>RsaI</i>	CYP2E1*1A alel: 360 + 50 CYP2E1*5B alel: 410	2% agarozna GE
GSTM1 (+/-) i GSTT1 (+/-)	215 i 480	-	-	2% agarozna GE
GSTP1 (Ile105Val)	430	<i>BsmAI</i>	105Ile alel: 329 + 101 105Val alel: 222 + 107 + 101	2% agarozna GE
mEPHX (S)	162	<i>EcoRV</i>	wt alel: 142 + 20 S alel: 162	4% agarozna GE
mEPHX (F)	210	<i>RsaI</i>	wt alel: 210 F alel: 164 + 46	3% agarozna GE
MMP1 (G-1607GG)	200/199	-	-	CSGE
MMP9 (C-1562T)	435	<i>PaeI</i>	-1562C alel: 435 -1562T alel: 247 + 188	2% agarozna GE
MMP12 (A-82G)	199	<i>PvuII</i>	-82A alel: 199 -82G alel: 175 + 24	3% NuSieve-Seakem (3:1) agarozna GE
A1AT (Z, S)	210 i 146	<i>TaqI</i>	PI M alel: 210 PI Z alel: 181 + 29 PI M alel: 146 PI S alel: 119 + 27	4% agarozna GE
TNF α (A-308G)	345	<i>NcoI</i>	-308G alel: 325 + 20 -308A alel: 345	4% NuSieve-Seakem (3:1) agarozna GE
CFTR (M470V)	491	<i>HphI</i>	M470 alel: 491 V470 alel: 300 + 191	2% agarozna GE
CFTR (9T, 7T i 5T)	261	<i>HpaI</i>	9T alel: 261 7T alel: 237 + 22 5T alel: 237 + 22	3,5% agarozna GE
CFTR (F508del)	219	<i>MboI</i>	wt alel: 219 F508del alel: 202 + 17	3% NuSieve-Seakem (3:1) agarozna GE
CFTR (egzoni 3, 10 i 11)	223, 323 i 336	-	9T ili 7T alel: 261 5T alel: 237 + 22	DGGE

CYP-eng. Cytochrome; GST-glutation-S-transferaza; mEPHX-eng. Microsomal Epoxide Hydrolase; MMP-eng. Matrix Metalloproteinase; α_1 AT- α_1 antitripsin; TNF α -eng. Tumor Necrosis Factor α ; CFTR-eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; GE-gel elektroforeza; CSGE-eng. Conformation Sensitive Gel Electrophoresis; DGGE-eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.



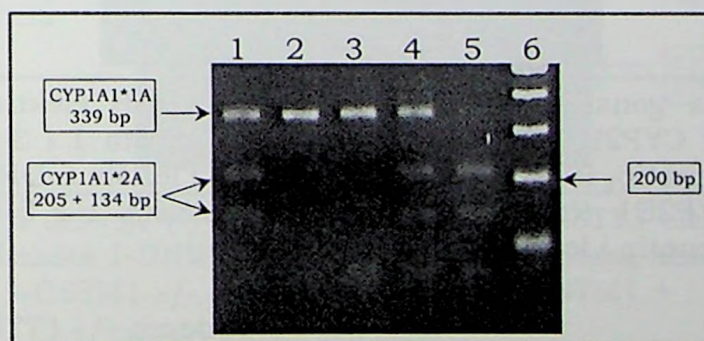
Slika 14. Šematski prikaz eksperimentalnog pristupa u ispitivanju uloge odabranih genskih varijanti u patogenzi HOBP.

Šematski prikaz eksperimentalnog dizajna studije, koji je obuhvatio analizu odabranih genskih varijanti, statističku obradu podataka i odabir kandidata za funkcionalnu analizu dat je na Slici 14.

4.2.1. Analiza varijanti gena uključenih u ravnotežu oksidanti-antioksidanti

4.2.1.1. Detekcija i distribucija genske varijante *1A/*2A gena CYP1A1

U 3' flanking regionu gena CYP1A1 detektovana je genska varijanta T→C na poziciji 3801 metodom PCR-RFLP (Hayashi¹ et al. 1991). Alel 3801T označen je kao CYP1A1 *1A, dok je 3801C označen kao CYP1A1 *2A, poznat i kao *MspI* polimorfizam, na osnovu restrikcionog enzima koji prepoznaje polimorfnu sekvencu. Detekcija je vršena nakon razdvajanja produkata digestije na 2% agaroznom gelu, pri čemu je prisustvo alela CYP1A1 *1A odgovaralo fragmentu od 339 bp, a alela CYP1A1 *2A fragmentima od 205 i 134 bp (Slika 15).

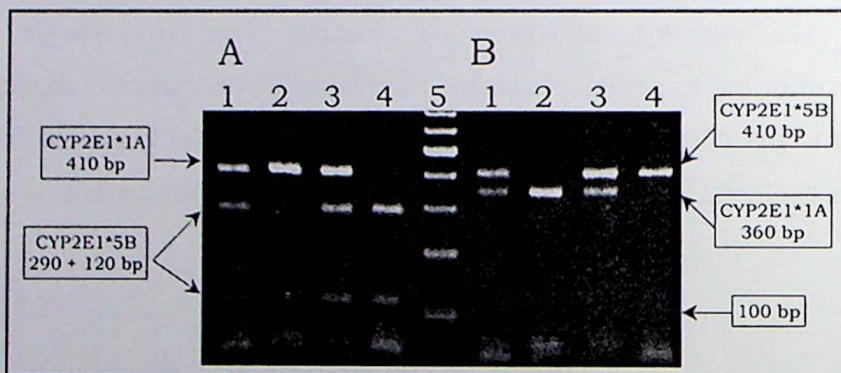


Slika 15. Detekcija genske varijante CYP1A1 *1A/*2A elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Ležišta 1 i 4-*1A/*2A genotip, ležišta 2 i 3-*1A/*1A genotip, ležište 5-*2A/*2A genotip i ležište 6-DNK lestvica 100 bp (Fermentas). CYP-eng. Cytochrome.

Poređenjem učestalosti alela i genotipova nije uočena značajna razlika između grupe pacijenata i kontrolnih grupa (K i PK) (Tabela 15).

4.2.1.2. Detekcija i distribucija genske varijante *1A/*5B gena CYP2E1

U 5' flanking regionu gena CYP2E1 opisane su dve genske varijante, jedna na poziciji -1293 G→C, koja se detektuje digestijom PCR fragmenta enzimom *RsaI* i druga na poziciji -1053 C→T koja se detektuje *PstI* restrikcijom enzimom (Kato et al. 1992). Ove dve varijante se nasleđuju vezano. Mutirani alel se označava kao CYP2E1 *5B i njegovo prisustvo rezultuje u odsustvu *RsaI* i prisustvu *PstI* restrikcijom mesta. Alel wt je označen kao CYP2E1 *1A i karakteriše ga prisustvo *RsaI* i odsustvo *PstI* restrikcijom mesta. Digestijom PCR fragmenta od 410 bp enzimom *PstI* dobijaju se fragmenti dužine 290 bp i 120 bp, a enzimom *RsaI* fragmenti dužine 360 bp i 50 bp (Slika 16 A i B). Analiza produkata digestije vršena je na 2% agaroznom gelu.

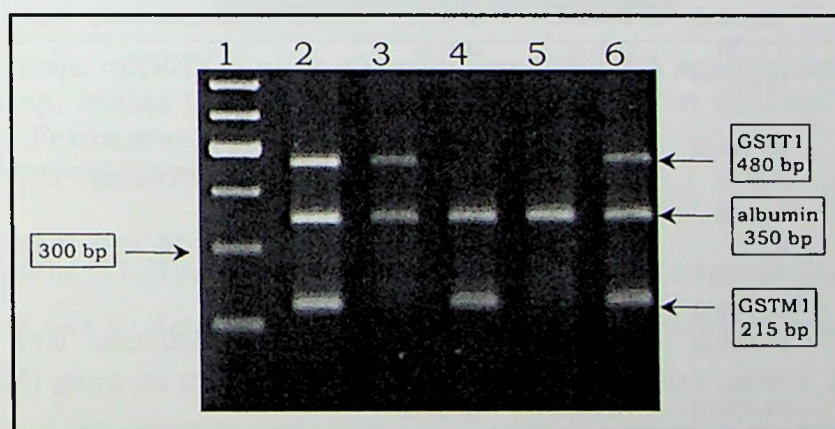


Slika 16. Detekcija genske varijante CYP2E1 *1A/*5B elektroforezom na 2% agaroznom gelu. A: CYP2E1 *PstI* genska varijanta, ležišta 1 i 3-*1A/*5B genotip, ležište 2-*1A/*1A genotip, ležište 4-*5B/*5B genotip i ležište 6-DNK lestvica 100 bp (Fermentas); B: CYP2E1 *RsaI* genska varijanta, ležišta 1 i 3-*1A/*5B genotip, ležište 2-*1A/*1A genotip i ležište 4-*5B/*5B genotip. CYP-eng. Cytochrome.

Poređenjem učestalosti alela i genotipova nije uočena statistički značajna razlika između grupe pacijenata i kontrolnih grupa (K i PK) (Tabela 15). Distribucija CYP2E1 *1A/*5B varijante nije bila u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži u pušačkoj kontrolnoj grupi, gde su detektovana dva heterozigotna i jedan homozigotni nosilac CYP2E1 *5B alela ($p < 0,05$; $\chi^2 = 11,48$, za $d = 1$). Za dobijenu učestalost CYP2E1 *5B alela od 0,04, ne očekuje se prisustvo jednog homozigotnog nosioca.

4.2.1.3. Detekcija i distribucija genskih varijanti u genima GSTM1, GSTT1 i GSTP1

U genima za GSTM1 i GSTT1 opisane su promene koje dovode do delecija ovih gena i izostanka proteinskog produkta. Detekcija GSTM1 $-/-$ i GSTT1 $-/-$ genskih varijanti vrši se multipleks PCR reakcijom, pri čemu se umnožava i deo gena za albumin, kao interna kontrola PCR reakcije (Arand et al. 1996). Dužine PCR produkta iznose 215 bp za GSTM1, 480 bp za GSTT1 i 350 bp za albumin. Umnoženi fragmenti se analiziraju na 2% agaroznom gelu. Kada su geni za GSTM1 i GSTT1 prisutni na jednom ili oba hromozoma, detektuje se traka odgovarajuće dužine, dok u slučaju delecije ovih gena na oba hromozoma umnožavanje u PCR reakciji izostaje i uočava se samo traka koja potiče od dela gena za albumin (Slika 17). Poređenjem učestalosti alela i genotipova nije uočena statistički značajna razlika između grupe pacijenata i kontrolnih grupa (K i PK) (Tabela 15).



Slika 17. Detekcija delecije ($-/-$) u genima GSTM1 i GSTT1 elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Ležište 1-DNK lestvica 100 bp (Fermentas), ležišta 2 i 6-GSTM1 + i GSTT1 +, ležište 3-GSTM1 $-/-$ i GSTT1 +, ležište 4-GSTM1 + i GSTT1 $-/-$ i ležište 5-GSTM1 $-/-$ i GSTT1 $-/-$ genotipovi.

GST-glutation-S-transferaza.

U genu za GSTP1 analizirana je varijanta na poziciji +313 A→G, u 5. egzonu, koja na proteinskom nivou dovodi do aminokiselinske zamene Ile→Val na poziciji 105 (Ishii et al. 1999). Detekcija je vršena PCR-RFLP metodom, a produkti digestije su analizirani elektroforezom u 2% agaroznom gelu. Dužina PCR produkta iznosi 430 bp, a nakon digestije, restrikcionim enzimom *BsmAI*, 329 bp i 101 bp kada je prisutan wt alel (105Ile), odnosno 222 bp, 107 bp i 101 bp kada je prisutan 105Val alel (Slika 18). Poređenjem učestalosti alela i genotipova nije uočena statistički značajna razlika između grupe pacijenata i kontrolnih grupa (K i PK) (Tabela 15).

Rezultati



Slika 18. Detekcija varijante Ile105Val u genu GSTP1 elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Ležište 1-Ile/Ile genotip, ležišta 2 i 4-Ile/Val genotip, ležište 3-Val/Val genotip i ležište 5-DNK lestvica 100 bp (Fermentas). GST-glutation-S-transferaza.

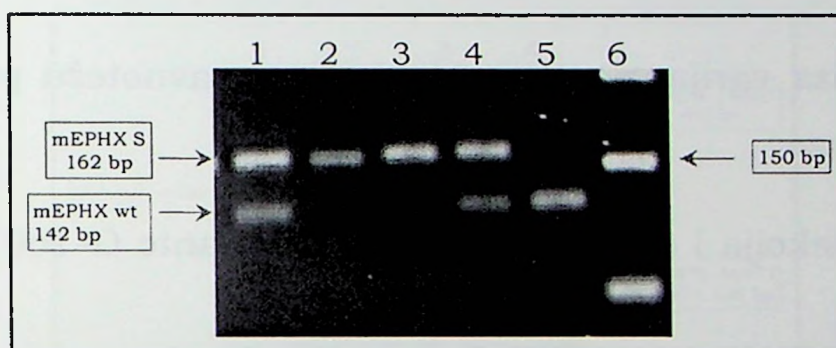
Tabela 15. Distribucija analiziranih alela i genotipova u okviru gena CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 i mEPHX kod obolelih od HOBP i kontrolnih grupa.

gen	genotip, alel	HOBP	K	PK	HOBP vs. K		HOBP vs. PK	
		n=86 (%)	n=100 (%)	n=50 (%)	p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)
CYP1A1	*1A/*1A	69 (80,2)	83 (83,0)	42 (84,0)	0,85	1,12 (0,53-2,37)	0,82	1,20 (0,47-3,04)
	*1A/*2A	16 (18,6)	17 (17,0)	8 (16,0)				
	*2A/*2A	1 (1,2)	0 (0,0)	0 (0,0)				
	*2A	0,105	0,085	0,080				
CYP2B1	*1A/*1A	83 (96,5)	96 (96,0)	47 (94,0)	1	1,17 (0,23-5,95)	1	0,87 (0,14-5,38)
	*1A/*5B	3 (3,5)	3 (3,0)	2 (4,0)				
	*5B/*5B	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (2,0)				
	*5B	0,017	0,025	0,04				
GSTM1	+	35 (40,7)	53 (53,0)	22 (44,0)	0,11	1,64 (0,92-2,94)	0,72	1,14 (0,57-2,32)
	-/-	51 (59,3)	47 (47,0)	28 (56,0)				
GSTT1	+	65 (75,6)	76 (76,0)	43 (86,0)	1	1,02 (0,52-2,00)	0,19	1,98 (0,78-5,07)
	-/-	21 (24,4)	24 (24,0)	7 (14,0)				
GSTP1	Ile/Ile	36 (41,9)	45 (45,0)	25 (50,0)	0,63	1,33 (0,51-3,44)	1	1,18 (0,38-3,68)
	Ile/Val	40 (46,5)	46 (46,0)	20 (40,0)				
	Val/Val	10 (11,6)	9 (9,0)	5 (10,0)				
	Val	0,349	0,320	0,300				
mEPHX	wt/wt	43 (50,0)	48 (48,0)	21 (42,0)	0,76	0,89 (0,49-1,61)	0,86	0,89 (0,43-1,82)
	wt/S	32 (37,2)	40 (40,0)	20 (40,0)				
	S/S	11 (12,8)	12 (12,0)	9 (18,0)				
	S	0,314	0,320	0,380				
mEPHX	wt/wt	58 (67,4)	66 (66,0)	36 (72,0)	0,63	1,18 (0,63-2,21)	0,33	1,53 (0,69-3,37)
	wt/F	28 (32,6)	29 (29,0)	12 (24,9)				
	F/F	0 (0,0)	5 (5,0)	2 (4,0)				
	F	0,163	0,195	0,160				

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; K-kontrolna grupa; PK-pušačka kontrolna grupa; p-statistička značajnost; OR(CI)-eng. odds ratio (confidence interval); CYP-eng. Cytochrome; GST-glutation-S-transferaza; mEPHX-eng. Microsomal Epoxide Hydrolase.

4.2.1.4. Detekcija i distribucija genskih varijanti S i F gena mEPHX

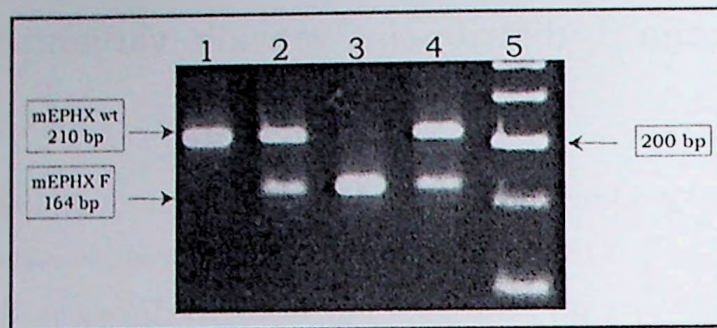
U genu za mEPHX detektovane su dve varijante (Smith et al. 1997). Nukleotidna zamena T→C u egzonu 3 (E3) gena za mEPHX koja dovodi do zamene Tyr→His na poziciji 113 u proteinu i predstavlja "slow" ili S alel. Detekcija S alela vršena je metodom PSM-RFLP. PCR produkti su digerirani restrikcionskim enzimom *EcoRV* i analizirani elektroforezom na 4% agaroznom gelu (Slika 19).



Slika 19. Detekcija mEPHX S alela elektroforezom na 4% agaroznom gelu. Ležišta 1 i 4-wt/S genotip, ležišta 2 i 3-S/S genotip, ležište 5-wt/wt genotip i ležište 6-DNK lestvica 50 bp (Fermentas).

mEPHX-eng. Microsomal Epoxide Hydrolase.

Prisustvo wt alela (113Tyr) potvrđuje obrazac traka koje odgovaraju dužinama 142 bp i 20 bp, a S alel se detektuje trakom dužine 162 bp. Nukleotidna promena A→G u egzonu 4 (E4) gena za mEPHX uvodi zamenu His→Arg na mestu 139 u proteinu i označava se kao "fast" ili F alel. Promena je detektovana metodom PCR-RFLP, a digestija je vršena enzimom *RsaI*. Produkti digestije su vizualizovani nakon elektroforeze na 3% agaroznom gelu. Prisustvo trake od 210 bp predstavlja wt alel (139His), dok se obrazac traka 164 bp i 46 bp uočava kada je prisutan F alel (Slika 20). Poređenjem učestalosti alela i genotipova nije uočena statistički značajna razlika između grupe pacijenata i kontrolnih grupa (K i PK) (Tabela 15).



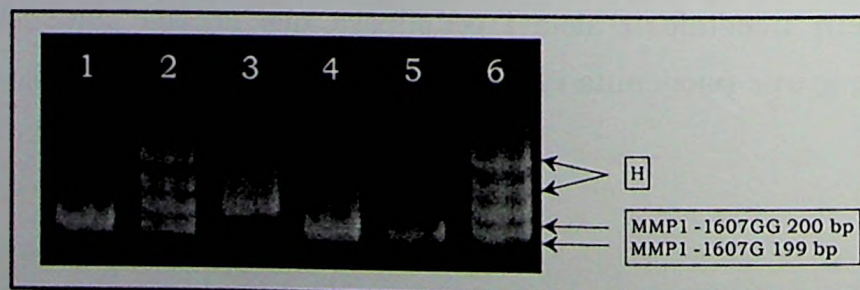
Slika 20. Detekcija mEPHX F alela elektroforezom na 3% agroznom gelu. Ležište 1-wt/wt genotip, ležišta 2 i 4-wt/F genotip, ležište 3-F/F genotip i ležište 5-DNK lestvica 50 bp (Fermentas).

mEPHX-eng. Microsomal Epoxide Hydrolase.

4.2.2. Analiza varijanti gena uključenih u ravnotežu proteinaze-antiproteinaze

4.2.2.1. Detekcija i distribucija genske varijante G-1607GG gena MMP1

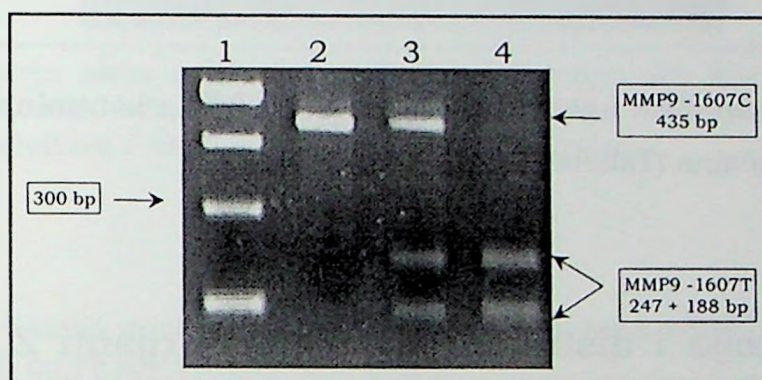
Detekcija varijante G-1607GG u promotoru gena za MMP1 vršena je metodom CSGE. Za detekciju ove alelske varijante standardizovana je metoda koja omogućava razdvajanje PCR fragmenata dužine 199 i 200 bp (Stankovic¹ et al. 2009). Kod heterozigotnih nosilaca pored traka koje odgovaraju -1607G i -1607GG varijantama, uočavaju se i heterozavojnice koje nastaju sparivanjem lanaca koji nisu potpuno komplementarni u regionu polimorfne sekvence i zaostaju na gelu (Slika 21). Dobijeni rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku u distribuciji alela i genotipova za ispitivanu varijantu MMP1 između pacijenata i kontrola (Tabela 16).



Slika 21. Detekcija varijante G-1607GG u genu MMP1 CSGE metodom. Ležište 1, 4 i 5-G/G, 2 i 6-G/GG, 3-GG/GG genotip, H-heterozavojnice. MMP-eng. Matrix Metalloproteinase.

4.2.2.2. Detekcija i distribucija genske varijante C-1562T gena MMP9

Za detekciju varijante C-1562T u promotoru gena za MMP9 korišćena je metoda PCR-RFLP (Yanchina et al. 2004). Produkti PCR reakcije su digerirani restrikcijom enzimom *PaeI* i analizirani elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Kada je prisutan wt alel na gelu se uočava traka od 435 bp, dok su u slučaju varijante -1562T prisutne trake od 247 bp i 188 bp (Slika 22).



Slika 22. Detekcija varijante C-1562T u genu MMP9 elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Ležište 1-DNK lestvica 100 bp (Fermentas), ležište 2-C/C genotip, ležište 3-C/T genotip i ležište 4-T/T genotip. MMP-eng. Matrix Metalloproteinase.

Poređenjem učestalosti C/T genotipa kod pacijenata i subjekata pušačke kontrolne grupe uočena je statistički značajna razlika (36,0% vs. 18%; OR=2,75 95%CI(1,10-5,98), $p=0,03$). Poređenjem distribucija T alela između ovih grupa, dobijena je granična p vrednost i faktor rizika koji iznosi približno 2 (0,203 vs. 0,110; OR=2,07 95%CI(0,99-4,28), $p=0,06$) (Tabela 16).

4.2.2.3. Detekcija i distribucija genske varijante A-82G gena MMP12

Detekcija varijante A-82G u promotoru gena za MMP12 vršena je primenom metode PSM-RFLP (Joos et al. 2002). Nakon digestije enzimom *PvuII* PCR fragmenti su analizirani elektroforezom na 3% NuSieve-Seakem (3:1) gelovima. Prisustvo wt alela, -82A, detektovano je trakom dužine 199 bp, dok je prisustvo varijante, -82G, identifikovano prisustvom traka od 175 bp i 24 bp (Slika 23).



Slika 23. Detekcija varijante A-82G u genu MMP12 elektroforezom na 3% agaroznom gelu. Ležište 1-A/A genotip, ležišta 2 i 4-A/G genotip, ležište 3-G/G genotip i 5-DNK lestvica 100 bp (Fermentas).
MMP-eng. Matrix Metalloproteinase.

Razlika u distribuciji alela i genotipova u grupi obolelih i kontrolnim grupama nije bila statistički značajna (Tabela 16).

4.2.2.4. Detekcija i distribucija genskih varijanti Z i S gena α_1 antitripsin

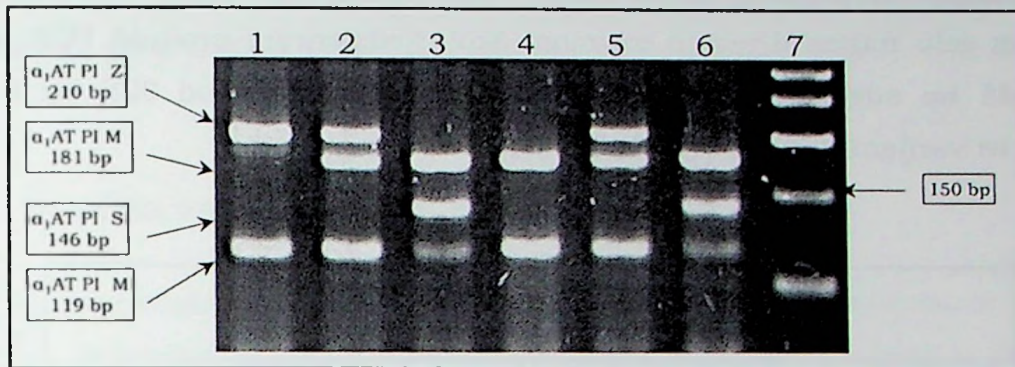
Prisustvo alela PI S i Z gena za α_1 AT analizirano je multipleks metodom PSM-RFLP (Lucotte et al. 1999). Mutirana PI Z alelska varijanta nastaje usled bazne zamene G→A u egzona 5 što dovodi do zamene Glu→Lys na poziciji 342 u proteinu. Mutacija koja dovodi do zamene A→T u egzonu 3, rezultuje zamenom Glu→Val na poziciji 264 u proteinu i predstavlja PI S alel. Fragmenti DNK koji sadže PI Z i S alelska mesta umnoženi su u mutipleks PCR reakciji i analizirani digestijom restrikcionim enzimom *TaqI* u simultanoj reakciji. Detekcija alela vršena je nakon elektroforeze na 4% agaroznom gelu (Slika 24).

Kada su Z i S mutacije prisutne, izostaje digestija odgovarajućih DNK fragmenata i detektuju se trake od 210 bp za fragment koji nosi varijantu Z, i 146 bp za fragment koji nosi varijantu S. Kada je prisutan wt alel (PI M), nakon digestiji sa enzimom *TaqI* dobijaju se fragmenti dužina 181 bp i 29 bp (poreklom od 210 bp) i 119 bp i 27 bp (poreklom od 146 bp).

U podgrupi pacijenata sa emfizemom pluća distribucija α_1 AT PI Z varijante nije bila u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži ($p < 0,05$; $\chi^2 = 21,82$, za $d=1$). U ovoj podgrupi pacijenata detektovana su tri homozigotna i jedan heterozigotni nosilac PI Z alela.

Rezultati

Za dobijenu učestalost α_1 AT Z alela od 0,052, ne očekuje se prisustvo homozigotnih nosilaca, kao što je detektovano kod 3 ispitanika obolela od emfizema (Tabela 16).



Slika 24. Detekcija alela α_1 AT PI S i Z elektroforezom na 4% agaroznom gelu. Ležište 1-Z/Z genotip, ležišta 2 i 5-M/Z genotip, ležišta 3 i 6-M/S genotip, ležište 4-M/M genotip i ležište 7-DNK lestvica 50 bp (Fermentas). α_1 AT- α_1 antitripsin.

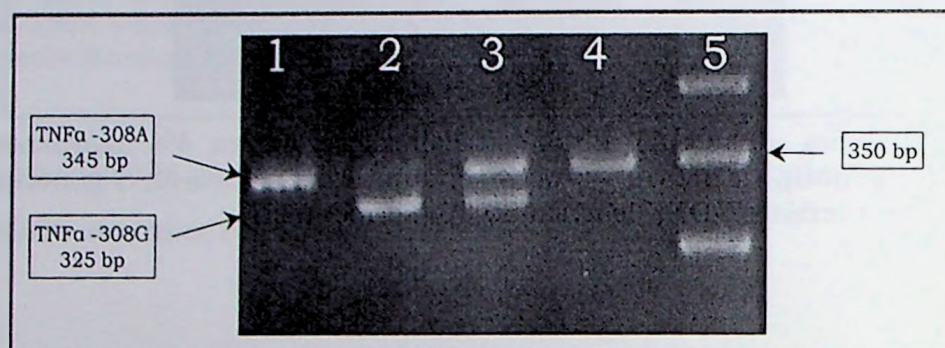
Tabela 16. Distribucija analiziranih alela i genotipova gena MMP1, MMP9, MMP12 i α_1 AT kod obolelih od HOBP i kontrolnih grupa.

gen	genotip, alel	HOBP	K	PK	HOBP vs. K		HOBP vs. PK	
		n=86 (%)	n=100 (%)	n=50 (%)	p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)
MMP1	G/G	24 (27,9)	33 (33)	17 (34)	0,77	0,91 (0,51-1,61)	1	0,94 (0,47-1,89)
	G/GG	40 (46,5)	49 (49)	24 (48)				
	GG/GG	22 (25,6)	18 (18)	9 (18)				
	GG	0,488	0,425	0,420				
MMP9	C/C	53 (61,6)	72 (72,0)	40 (80,0)	0,08	1,78 (0,94-3,37)	0,03	2,57 (1,10-5,98)
	C/T	31 (36,1)	24 (24,0)	9 (18,0)				
	T/T	2 (2,3)	4 (4,0)	1 (2,0)				
	T	0,203	0,160	0,110				
MMP12	A/A	69 (80,2)	73 (73,0)	35 (70,0)	0,29	0,67 (0,33-1,38)	0,27	0,60 (0,26-1,40)
	A/G	15 (17,5)	24 (24,0)	13 (26,0)				
	G/G	2 (2,3)	3 (3,0)	2 (4,0)				
	G	0,110	0,150	0,170				
α_1 AT	M/M	79 (91,8)	97 (97,0)	49 (98,0)	0,07	3,63 (0,97-13,61)	0,10	5,47 (0,68-43,80)
	M/Z	3 (3,5)	3 (3,0)	1 (2,0)				
	Z/Z	3 (3,5)	0 (0,0)	0 (0,0)				
	M/S	1 (1,2)	0 (0,0)	0 (0,0)				
	Z	0,052	0,015	0,01				
	S	0,006	0,00	0,00				

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; K-kontrolna grupa; PK-pušačka kontrolna grupa; p-statistička značajnost; OR(CI)-eng. odds ratio (confidence interval); MMP-eng. Matrix Metalloproteinase; α_1 AT- α_1 antitripsin.

4.2.3. Detekcija i distribucija genske varijante G-308A gena TNF α

Varijanta G-308A u promotoru gena za TNF α analizirana je metodom PSM-RFLP (Sakao et al. 2001). Detekcija je vršena elektroforezom na 4% NuSieve-Seakem (3:1) agaroznom gelu nakon digestije enzimom *Nco*I. Nedigerirani produkt PCR reakcije dužine 345 bp odgovara alelu -308A, dok prisustvo traka od 325 bp i 20 bp odgovara wt varijanti (-308G alel) (Slika 25).



Slika 25. Analiza varijante G-308A u genu TNF α elektroforezom na 4% agaroznom gelu. Ležišta 1 i 4-A/A genotip, ležište 2-G/G genotip, ležište 3-G/A genotip i ležište 5-DNK lestvica 50 bp (Fermentas).

TNF α -eng. Tumor Necrosis Factor α .

Tabela 17. Distribucija alela i genotipova varijante G-308A gena TNF α kod obolelih od HOBP i kontrolnih grupa.

gen	genotip, alel	HOBP n=86 (%)	K n=100 (%)	PK n=50 (%)	HOBP vs. K		HOBP vs. PK	
					p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)
TNF α	G/G	71 (82,5)	69 (69,09)	33 (66,0)	0,04	2,13 (1,06-4,28)	0,036	2,44 (1,09-5,47)
	G/A	14 (16,3)	28 (28,0)	14 (28,0)	0,08	0,50 (0,24-1,03)	0,13	0,50 (0,22-1,16)
	A/A	1 (1,2)	3 (3,0)	3 (6,0)				
	A	0,093	0,170	0,200	0,033	0,50 (0,27-0,94)	0,016	0,41 (0,20-0,83)

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; K-kontrolna grupa; PK-pušačka kontrolna grupa; p-statistička značajnost; OR(CI)-eng. odds ratio (confidence interval); TNF α -eng. Tumor Necrosis Factor α .

Učestalost genotipa G/G je bila veća u grupi pacijenata (82,6%), u poređenju sa kontrolnim grupama K (69,0%) i PK (66,0%), a razlika statistički značajna u poređenju sa kontrolnim grupama K (OR=2,13 95%CI(1,06-4,28), p=0,041) i PK (OR=2,44 95%CI(1,09-5,47), p=0,036). Učestalost mutiranog alela -308A, bila je snižena kod pacijenata (9,3%) u odnosu na kontrolne grupe K (17,0%) i PK (20,0%). U oba slučaja razlika je bila statistički značajna, kada su poredene grupe

pacijeneta sa kontrolnom grupom K (OR=0,50 95%CI(0,27-0,94), p=0,033) i kontrolom grupom PK (OR=0,41 95%CI(0,20-0,83), p=0,016). Rezultati ukazuju da prisustvo alela -308G nosi faktor rizika od približno 2 za pojavu HOBP, dok prisustvo alela -308A ima protektivnu ulogu i smanjuje rizik za pojavu bolesti približno dva puta (Tabela 17).

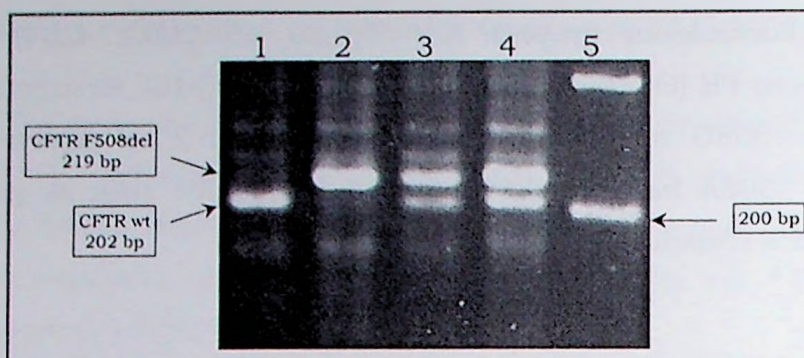
4.2.4. Analiza varijanti gena za cističnu fibrozu

Dvanaest pacijenata iz grupe sa emfizemom, kao i 19 pacijenata iz grupe sa hroničnim bronhitisom kao dominantnim simptomima je obrađeno u prethodnoj studiji u kojoj je vršen skrining svih egzona gena CFTR (Divac et al. 2004). Za odabrane genske varijante gena CFTR, koje su analizirane u ovoj studiji, korišćeni su podaci studije Divac i saradnika. Kod preostalih 10 pacijenata sa emfizemom i 36 pacijenata sa hroničnim bronhitisom analizirano je prisustvo varijanti F508del, M470V, Tn lokusa, i urađen je skrining egzona 3, 10 i 11 u genu CFTR.

4.2.4.1. Detekcija i distribucija mutacije F508del gena CFTR

Prisustvo mutacije F508del analizirano je metodom PSM-RFLP (Friedman et al. 1991). Mutacija F508del predstavlja deleciju 3 bp u egzonu 10 CFTR gena što dovodi do delecije fenilalanina na mestu 508 u proteinu CFTR. Umnoženi fragment koji sadrži ovaj deo sekvence gena ima dužinu od 219 bp. Ukoliko je prisutna wt sekvenca, nakon digestije enzimom *Mbo*I, dobija se fragment dužine 202 bp. Ukoliko je prisutna mutacija, restrikciono mesto se ukida, i dobija se fragment dužine 219 bp. Mutacija je detektovana elektroforezom na 3% NuSieve-Seakem (3:1) agaroznom gelu (Slika 26).

Prisustvo ove mutacije je ustanovljeno kod 5 pacijenata i jednog ispitanika u kontrolnoj grupi. Mutacija je bila prisutna kao heterozigotni genotip i mada se skoro 6 puta češće javlja kod obolelih u odnosu na kontrolnu grupu (5,8% vs. 1%) razlika nije bila statistički značajna (Tabela 18).

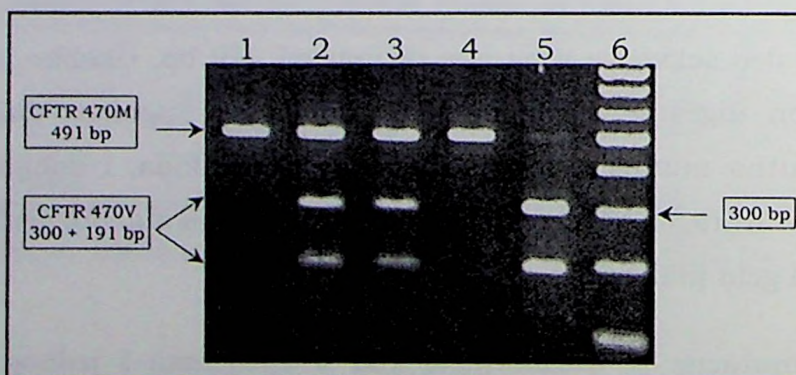


Slika 26. Detekcija mutacije F508del elektroforezom na 3% agaroznom gelu. Ležište 1-wt/wt genotip, ležište 2-F508del/F508del genotip, ležišta 3 i 4-wt/F508del genotip i 5-DNK lestvica 100 bp (Fermentas).

CFTR-eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.

4.2.4.2. Detekcija i distribucija genske varijante M470V gena CFTR

Detekcija varijante M470V vršena je metodom PCR-RFLP (Fujiki et al. 2004). Usled nukleotidne zamene A→G na poziciji 1540 u egzonu 10 gena za CFTR dolazi do aminokiselinske zamene Met→Val na poziciji 470 u proteinu. Produkti PCR reakcije su nakon digestije enzimom *HphI* vizuelizovani elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Prisustvo varijante 470V određuje obrazac traka od 300 bp i 191 bp, dok je u slučaju alela 470M prisutna traka od 491 bp (Slika 27).



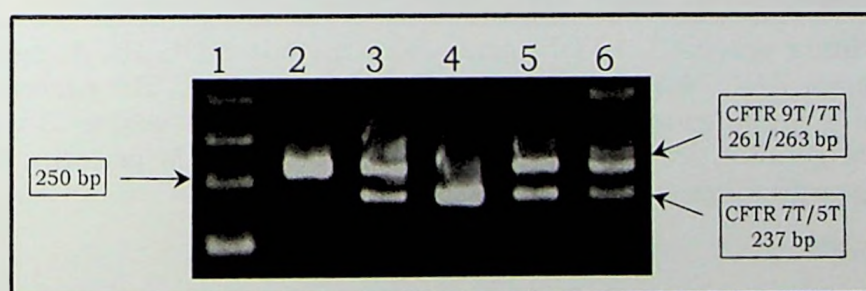
Slika 27. Detekcija varijante M470V, egzona 10 gena CFTR, elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Ležišta 1 i 4-M/M genotip, ležišta 2 i 3-M/V genotip, ležište 5-V/V genotip i ležište 6-DNK lestvica 100 bp (Fermentas).

CFTR-eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.

Za ovu gensku varijantu nisu uočene značajne razlike u distribuciji alela i genotipova među analiziranim grupama (Tabela 18).

4.2.4.3. Detekcija i distribucija genskih varijanti Tn lokusa gena CFTR

Analiza Tn lokusa vršena je metodom PCR-RFLP. Varijante Tn lokusa podrazumevaju prisustvo različitog broja timina (5, 7 ili 9) u intronu 8 gena CFTR od čega zavisi obrada iRNK (Shrimpton 2000). Segment DNK u kome se nalazi ova promena najpre je umnožen pomoću oligonukleotida CF9RR i CF7T, pri čemu se umnožavaju samo aleli 7T i 9T, dok se alel 5T ne umnožava. Produkti umnožavanja analiziraju se nakon digestije restrikcionim enzimom *HpaI* elektroforezom na 3,5% agaroznom gelu. Kada je prisutan alel 9T dužina PCR fragmenta je 261 bp, dok u slučaju alela 7T iznosi 259 bp. Nakon digestije dobijaju se fragmenti od 237 bp i 22 bp koji ukazuju na prisustvo 7T alela. Kad je detektovan samo jedan od ova dva alela analizira se prisustvo 5T varijante. Za detekciju 5T varijante koriste se oligonukleotidi CF9RR i CF5T, pri čemu se u PCR reakciji mogu umnožiti sva tri alela. Dužine dobijenih fragmenata iznose 259 bp u slučaju 5T alela, 261 bp u slučaju 7T alela i 263 bp u slučaju 9T alela. Sekvenca sa 5T alelom sadrži restrikciono mesto za *HpaI* enzim, pa se digestijom dobijaju fragmenti od 237 bp i 22 bp, dok sekvence sa 7T ili 9T alelima ne sadrže restrikciono mesto (Slika 28).



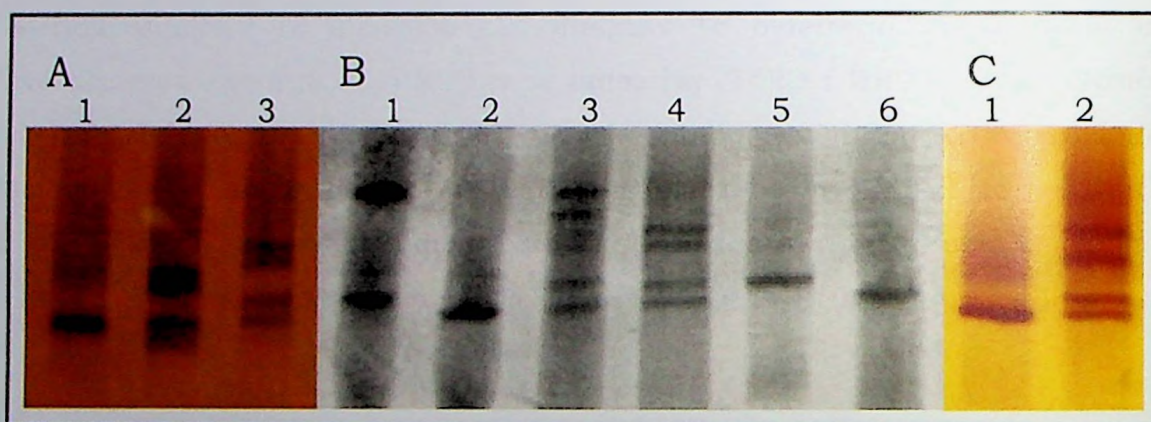
Slika 28. Detekcija varijanti u okviru Tn lokusa u intronu 8 CFTR gena elektroforezom na 3,5% agaroznom gelu. Ležište 1-DNK lestvica 50 bp (Fermentas), ležište 2-9T/9T genotip, ležišta 3 i 6-9T/7T genotip, ležište 4-7T/7T genotip i ležište 5-7T/5T genotip.

CFTR-eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.

Distribucija alela 5T i heterozigotnih nosioca alela 5T je slična među analiziranim grupama. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 18.

4.2.4.4. Detekcija i distribucija genskih varijanti egzona 3, 10 i 11 gena CFTR

Skrining egzona 3, 10 i 11 vršen je metodom DGGE (Fanen et al. 1992, Costes et al. 1993). Kod jednog pacijenta i dva subjekta u pušačkoj kontrolnoj grupi uočene su promene u egzonu 3 za koje je sekvenciranjem ustanovljeno da su heterozigotni nosioci R75Q alela (Slika 29 A). Kod jednog ispitanika u kontrolnoj grupi uočena je promena u egzonu 10, a sekvenciranjem je utvrđeno prisustvo 1716G→A promene u heterozigotnom stanju (Slika 29 B). Prilikom analize egzona 11 nije detektovano prisustvo promena u sekvenci kod analiziranih ispitanika (Slika 29 C).



Slika 29. Skrining egzona 3, 10 i 11 gena CFTR metodom DGGE. A: egzon 3, ležište 1-wt genotip, 2-74R/74W genotip, 3-75R/75Q genotip; B: egzon 10, ležište 1-wt/F508del i M/M genotip, ležišta 2 i 6-V/V genotip, ležište 3-wt/1716G→A genotip i M/M genotip, ležište 4-M/V genotip, ležište 5-M/M genotip; C: egzon 11, ležište 1-wt genotip i ležište 2-wt/G542X genotip.

Iako učestalost varijante 75Q nije pokazala signifikantnu razliku među testiranim grupama, distribucija ove varijante nije bila u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži u grupi pacijenata, gde su detektovana četiri heterozigotna i jedan homozigotni nosilac ($p < 0,05$; $\chi^2 = 8,22$; za $d = 1$). Za učestalost 75Q alela od 0,035 nije očekivano prisustvo jednog homozigotnog nosioca, kao što je dobijeno u ovoj studiji. Rezultati ispitivanih varijanti u genu za cističnu fibrozu su prikazani u Tabeli 18.

Rezultati

Tabela 18. Distribucija alela i genotipova genskih varijanti F508del, M470V, Tn lokusa i R75Q gena CFTR kod obolelih od HOBP i kontrolnih grupa.

genotip, alel	HOBP n=86 (%)	K n=100 (%)	PK n=50 (%)	HOBP vs. K		HOBP vs. PK	
				p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)
wt/wt	81 (94,2)	99 (99,0)	50 (100,0)	0,10	6,11 (0,70-53,37)		
wt/F508del	5 (5,8)	1 (1,0)	0 (0,0)				
F508del/F508del	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)				
	0,029	0,005	0				
M/M	18 (20,9)	18 (18,0)	9 (18,0)	0,88	1,09 (0,60-2,00)	1	1,00 (0,48-2,07)
M/V	37 (43,0)	48 (48,0)	23 (46,0)				
V/V	31 (36,1)	34 (34,0)	18 (36,0)				
V	0,576	0,580	0,590				
9/9	2 (2,3)	1 (1,0)	1 (2,0)	0,50	1,46 (0,60-3,57)	0,41	1,86 (0,57-6,13)
9/7	16 (18,6)	18 (18,0)	5 (10,0)				
7/7	56 (65,1)	71 (71,0)	40 (80,0)				
9/5	3 (3,5)	2 (2,0)	1 (2,0)				
7/5	9 (10,5)	8 (8,0)	3 (6,0)				
5	0,070	0,050	0,040				
R/R	81 (94,2)	98 (98,0)	48 (96,0)	0,25	3,02 (0,57-16,00)	1	1,48(0,28-7,94)
R/Q	4 (4,6)	2 (2,0)	2 (4,0)				
Q/Q	1 (1,2)	0 (0,0)	0 (0,0)				
Q	0,035	0,010	0,020				

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; K-kontrolna grupa; PK-pušačka kontrolna grupa; p-statistička značajnost; OR(CI)-eng. odds ratio (confidence interval).

4.2.5. Analiza složenih genotipova

Hronična opstruktivna bolest pluća je složeno oboljenje u čiju etiologiju su uključeni genetički i sredinski faktori, kao i njihova interakcija. Takođe se smatra da doprinos pojedinačnih genskih alela može biti relativno mali, dok prisustvo nekoliko štetnih alela može imati značajniji uticaj u patofiziologiji ove bolesti. Iz tog razloga ispitivane su kombinacije od dva i tri pojedinačna genotipa kao mogući složeni genetički faktori rizika za nastanak HOBP.

Analizirani su složeni genotipovi dobijeni kombinacijom alela: CYP1A1 *2A, CYP2E1 *5B, GSTM1 -/-, GSTT1 -/-, GSTP1 105Val, mEPHX S, mEPHX F, MMP1 -1607GG, MMP9 -1562T, MMP12 -82A, TNF α G-308A i CFTR F508del, CFTR M470V i CFTR 5T prisutnim na jednom ili oba hromozoma. Primenom Fišerovog egzaktnog testa ispitana je statistička značajnost razlika u distribuciji složenih genotipova između grupe pacijenata i kontrolnih grupa K i PK.

4.2.5.1. Složeni genotipovi, udruženost dva gena

Analizom udruženosti dva gena identifikovani su složeni genotipovi koji su sa statistički značajnom razlikom češće zastupljeni u grupi obolelih u odnosu na kontrolne grupe K i PK. Na osnovu dobijenih rezultata ustanovljena je udruženost genskih varijanti iz svih analiziranih grupa gena.

Tabela 19. Statistički značajne razlike u distribuciji složenih genotipova (kombinacije dva gena) dobijene poređenjem grupe pacijenata sa kontrolnim grupama K i PK.

udruženost gena i složenih genotipova	HOBP n=86 (%)	K n=100 (%)	PK n=50 (%)	HOBP vs. K		HOBP vs. PK	
				p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)
GSTM1:MMP9							
-/-:C/T	21 (24,4)	11 (11,0)	4 (8,0)	0,019	2,61 (1,18-5,80)	0,021	3,72 (1,20-11,55)
svi drugi	65 (75,6)	89 (89,0)	46 (92,0)				
GSTM1:TNFα							
-/-:G/G	42 (48,8)	31 (31,0)		0,016	2,12 (1,17-3,87)		
svi drugi	44 (51,2)	69 (69,0)					
GSTM1:CFTR							
-/-:F508del	4 (4,7)	0 (0,0)		0,044	10,96 (0,58-206,61)		
svi drugi	82 (95,3)	100 (100)					
MMP9:TNFα							
C/T:G/G	28 (32,6)	15 (15,0)	4 (8,0)	0,005	2,74 (1,34-5,57)	0,001	5,55 (1,82-16,96)
svi drugi	58 (67,4)	85 (85,0)	46 (92,0)				
MMP9:CFTR							
C/T:F508del	4 (4,7)	0 (0)		0,044	10,96 (0,58-206,61)		
svi drugi	82 (95,3)	100 (100)					
MMP12:TNFα:							
A/A:G/G	56 (65,1)		21 (42,0)			0,012	2,58(1,26-5,27)
svi drugi	30 (34,9)		29 (58,0)				
TNFα:CFTR							
G/G:F508del	5 (5,8)	0 (0,0)		0,020	13,56 (0,74-248,95)		
svi drugi	81 (94,2)	100 (100)					

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; K-kontrolna grupa; PK-pušačka kontrolna grupa; p-statistička značajnost; OR(CI)-eng. odds ratio (confidence interval); GST-glutation-S-transferaza; MMP-eng. Matrix Metalloproteinase; TNF α -eng. Tumor Necrosis Factor α ; CFTR-eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.

U ovoj studiji identifikovani su složeni genotipovi koji uključuju interakciju varijanti gena uključenih u odbranu od oksidativnog stresa, sa genima uključenim

u remodelovanje međućelijskog matriksa (GSTM1:MMP9), inflamaciju (GSTM1:TNF α) i mukocilijarni klirens (GSTM1:CFTR).

Takode su identifikovani složeni genotipovi koji uključuju udruženost varijanti u genima odgovornim za remodelovanje međućelijskog matriksa i inflamaciju (MMP9:TNF α i MMP12:TNF α) kao i u genima odgovornim za remodelovanje međućelijskog matriksa i mukocilijarni klirens (MMP9:CFTR).

Detektovana je i udruženost varijanti u okviru gena uključenih u inflamatorne procese i mukocilijarni klirens (TNF α :CFTR).

Neke od ovih interakcija identifikovane su samo prilikom poređenja grupe pacijenata sa jednom od kontrolnih grupa, dok su neke prisutne pri poređenju sa obe kontrolne grupe K i PK. Sve statistički značajne kombinacije prikazane su u Tabeli 19.

4.2.5.2. Složeni genotipovi, udruženost tri gena

Analizom udruženosti tri gena identifikovani su složeni genotipovi koji uključuju varijante gena odgovorne za odbranu od oksidativnog stresa, remodelovanje međućelijskog matriksa i inflamaciju.

U ovoj studiji detektovana je interakcija tri genske varijante gena uključenih u odbranu od oksidativnog stresa (CYP1A1:GSTM1:mEPHX), kao i gena uključenih u ksenobiotički metabolizam, remodelovanje međućelijskog matriksa i inflamaciju (CYP1A1:MMP9:TNF α , GSTM1:GSTP1:TNF α , GSTM1:MMP9:TNF α , GSTM1:MMP12:TNF α i GSTT1:MMP9:TNF α). Sve statistički značajne kombinacije genskih varijanti koje uključuju tri gena kao mogući faktor rizika za pojavu HOBP prikazane su u Tabeli 20.

Tabela 20. Statistički značajne razlike u distribuciji složenih genotipova (kombinacije tri gena) dobijene poredjenjem grupe pacijenata sa kontrolnim grupama K i PK.

udruženost gena i složenih genotipova	HOBP n=86 (%)	K n=100 (%)	PK n=50 (%)	HOBP vs. K		HOBP vs PK	
				p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)
CYP1A1:GSTM1:mEPHX							
*1A/*2A:-/-:S/(S)	6 (7,0)	1 (1,0)		0,050	7,42(0,88-62,95)		
svi drugi	80 (93,0)	99 (99,0)					
CYP1A1:MMP9:TNFα							
*1A/*2A:T/(T):G/G	8 (9,3)	2 (2,3)		0,046	5,03 (1,04-24,35)		
svi drugi	78 (90,7)	98 (98,0)					
GSTM1:GSTP1:TNFα							
-/-:Val/(Val):G/G	26 (30,2)	15 (15,0)		0,014	2,46 (1,20-5,03)		
svi drugi	60 (69,8)	85 (85,0)					
GSTM1:MMP9:TNFα							
-/-:T/(T):G/G	20 (23,3)	7 (7,0)	1 (2,0)	0,003	4,03 (1,61-10,07)	0,0005	14,85 (1,93-114,44)
svi drugi	66 (76,7)	93 (93,0)	49 (98,0)				
GSTM1:MMP12:TNFα							
-/-:A/A:G/G	33 (38,4)	24 (24,0)		0,04	1,97(1,05-3,71)		
svi drugi	53 (61,6)	76 (76,0)					
GSTT1:MMP9:TNFα							
-/-:T/(T):G/G	7 (8,1)		0 (0,0)			0,048	9,53 (0,53-170,49)
svi drugi	79 (91,9)		50 (100,0)				

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; K-kontrolna grupa; PK-pušačka kontrolna grupa; p-statistička značajnost; OR(CI)-eng. odds ratio (confidence interval); CYP-eng. Cytochrome; GST-glutation-S-transferaza; mEPHX-eng. Microsomal Epoxide Hydrolase; MMP-eng. Matrix Metalloproteinase; TNF α -eng. Tumor Necrosis Factor α .

4.2.6. Analiza modulatorne uloge genskih varijanti

Za analizu modulatornog uticaja pojedinačnih genotipova na težinu bolesti, grupa pacijenata je prema GOLD klasifikaciji podjeljena u dve podgrupe. Jedna podgrupa je obuhvatila 56 pacijenata sa teškom ili veoma teškom HOBP, tj. pacijente sa FEV₁<50, a druga, 30 pacijenata sa blagom ili umerenom HOBP, tj. pacijenata sa FEV₁≥50.

Za ispitivanje modulatorne uloge analiziranih genskih varijanti na godine starosti kada bolest nastupa, pacijenti su prema GOLD klasifikaciji svrstavani u dve podgrupe. Jedna je sadržala one kod kojih je bolest nastupila pre 40. godine života (23 pacijenta), a druga one kod kojih je nastupila od 40. godine života (63 pacijenata).

Rezultati

Analiza modulatorne uloge ispitivanih genskih varijanti pokazala je da prisustvo alela 470V na jednom ili oba CFTR gena predstavlja protektivni faktor za pojavu teške ili veoma teške HOBP. Nosioi alela 470V su zastupljeniji u podgrupi sa lakšom formom bolesti u odnosu na podgrupu bolesnika sa težom formom i razlika u njihovoj zastupljenosti je statistički značajna (71,4% vs. 93,3%; OR=0,18 95%CI(0,04-0,84), p=0,024). Nosioi jednog ili oba alela 470V imaju 5,5 puta manju šansu da obole od težeg oblika bolesti ($FEV_1 < 50$). Statistička značajnost je još izraženija kada se porede nosioci homozigotnog, genotipa 470VV (26,8% vs. 53,3%; OR=0,32 95%CI(0,13-0,81), p=0,019). Rezultati analize prikazani su u Tabeli 21.

Rezultati analize su takođe pokazali da je učestalost alela F gena za mEPHX snižena kod podgrupe pacijenata sa teškim oblikom bolesti u odnosu na one koji imaju lakši oblik HOBP. Mada ova razlika pokazuje graničnu p vrednost, rezultati ukazuju da nosioci alela F imaju 2,6 puta manju šansu za pojavu teške ili veoma teške HOBP kod obolelih (25,0% vs. 46,7%; OR=0,38 95%CI(0,15-0,97), p=0,054) (Tabela 21).

Rezultati analize nisu pokazali udruženost nijedne od ispitivanih varijanti gena sa pojavom bolesti pre ili od 40. godine života. Rezultati analize prikazani su u Tabeli 22.

Rezultati

Tabela 21. Analiza modulatorne uloge genskih alela u težini HOBP.

gen	genotip	FEV ₁ <50 n=56 (%)	FEV ₁ ≥50 n=30 (%)	p	OR (95%CI)
CYP1A1	*1A/*2A i *2A/*2A	11 (19,6)	6 (20,0)	1	0,98 (0,32-2,97)
	*1A/*1A	45 (80,4)	24 (80,0)		
GSTM1	-/-	37 (66,1)	16 (53,3)	0,26	1,70 (0,69-4,22)
	+	19 (33,9)	14 (46,7)		
GSTT1	-/-	14 (25,0)	7 (23,3)	1	1,10 (0,39-3,10)
	+	42 (75,0)	23 (76,7)		
GSTP1	Ile/Ile	20 (35,7)	16 (53,3)	0,17	0,49(0,20-1,20)
	Ile/Val i Val/Val	36 (64,3)	14 (46,7)		
GSTP1	Val/Val	7 (12,5)	3 (10,0)	1	1,29 (0,31-5,38)
	Ile/Ile i Ile/Val	49 (87,5)	27 (90,0)		
mEPHX	wt/S i S/S	26 (46,4)	17 (56,7)	0,50	0,66(0,27-1,62)
	wt/wt	30 (53,6)	13 (43,3)		
	S/S	5 (8,9)	6 (20,0)	0,18	0,39 (0,11-1,41)
	wt/wt i wt/S	51 (91,1)	24 (80,0)		
	wt/F	14 (25,0)	14 (46,7)	0,054	0,38 (0,15-0,97)
	wt/wt i F/F	42 (75,0)	16 (53,3)		
MMP1	G/GG i GG/GG	42 (75,0)	20 (66,7)	0,46	1,50 (0,57-3,96)
	G/G	14 (25,0)	10 (33,3)		
MMP9	C/T i T/T	25 (44,6)	8 (26,7)	0,11	2,22 (0,84-5,82)
	C/C	31 (55,4)	22 (73,3)		
MMP12	A/G i G/G	13 (23,2)	4 (13,3)	0,40	1,97 (0,58-6,67)
	A/A	43 (76,8)	26 (86,7)		
TNF α	G/A i A/A	10 (17,9)	5 (16,7)	1	1,09 (0,33-3,53)
	G/G	46 (82,1)	25 (83,3)		
CFTR	9/5 i 7/5	7 (12,5)	5 (16,7)	0,75	0,71(0,21-2,48)
	9/9, 9/7 i 7/7	49 (87,5)	25 (83,3)		
	M/V i V/V	40 (71,4)	28 (93,3)	0,024	0,18 (0,04-0,84)
	M/M	16 (28,6)	2 (6,7)		
	V/V	15 (26,8)	16 (53,3)	0,019	0,32 (0,13-0,81)
	M/M i M/V	41 (73,2)	14 (46,7)		
	wt/F508del	3 (5,4)	2 (6,7)	1	0,79 (0,12-5,02)
	wt/wt	53 (94,6)	28 (93,3)		
	wt/Q i Q/Q	4 (7,1)	1 (3,3)	0,65	2,23 (0,24-20,91)
	wt/wt	52 (92,9)	29 (96,7)		

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; K-kontrolna grupa; PK-pušačka kontrolna grupa; p-statistička značajnost; OR(CI)-eng. odds ratio (confidence interval); CYP-eng. Cytochrome; GST-glutation-S-transferaza; mEPHX-eng. Microsomal Epoxide Hydrolase; MMP-eng. Matrix Metalloproteinase; TNF α -eng. Tumor Necrosis Factor α ; CFTR-eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.

Rezultati

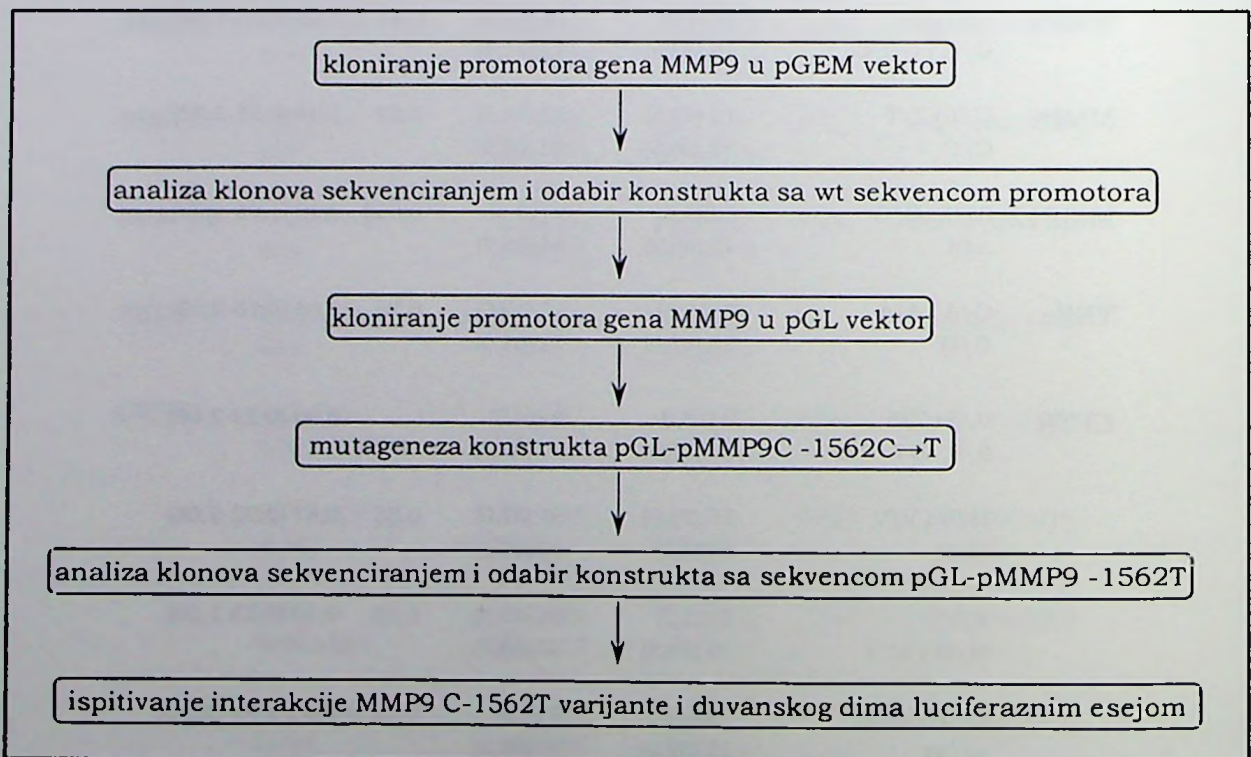
Tabela 22. Analiza modulatorne uloga alela prema starosti kada je bolest nastupila.

gen	genotip	PB<40 god N=23	PB≥40 god N=63	p	OR (95%CI)
CYP1A1	*1A/*2A i *2A/*2A	6 (26,1)	11 (17,5)	0,38	1,67(0,54-5,19)
	*1A/*1A	17 (73,9)	52 (82,5)		
GSTM1	-/-	10 (43,5)	41 (65,1)	0,086	0,41 (0,16-1,09)
	+	13 (56,5)	22 (34,9)		
GSTT1	-/-	5 (21,7)	16 (25,4)	1	0,82 (0,26-2,56)
	+	18 (78,3)	47 (74,6)		
GSTP1	Ile/Ile	11 (47,8)	25 (39,7)	0,62	1,39 (0,53-3,64)
	Ile/Val i Val/Val	12 (52,2)	38 (60,3)		
GSTP1	Val/Val	4 (17,4)	6 (9,5)	0,45	2,00 (0,51-7,85)
	Ile/Ile i Ile/Val	19 (82,6)	57 (90,5)		
mEPHX	wt/S i S/S	11 (47,8)	32 (50,8)	1	0,89 (0,34-2,31)
	wt/wt	12 (52,2)	31 (49,2)		
	S/S	4 (17,4)	7 (11,1)	0,47	1,68 (0,44-6,39)
	wt/wt i wt/S	19 (82,6)	56 (88,9)		
wt/F	11 (47,8)	17 (27,0)	0,076	2,48 (0,92-6,67)	
	wt/wt i F/F	12 (52,2)			46 (73,0)
MMP1	GG/GG	4 (17,4)	18 (28,6)	0,41	0,53 (0,16-1,76)
	G/G i G/GG	19 (82,6)	45 (71,4)		
MMP9	C/T i T/T	10 (43,5)	23 (36,5)	0,62	1,34 (0,51-3,53)
	C/C	13 (56,5)	40 (63,5)		
MMP12	A/G i G/G	8 (34,8)	9 (14,3)	0,063	3,20 (1,05-9,72)
	A/A	15 (65,2)	54 (85,7)		
TNF α	G/A i A/A	3 (13,0)	12 (19,0)	0,75	0,64 (0,16-2,50)
	G/G	20 (87,0)	51 (81,0)		
CFTR	9/5 i 7/5	3 (13,0)	9 (14,3)	1	0,90 (0,22-3,66)
	9/9, 9/7 i 7/7	20 (87,0)	54 (85,7)		
	M/V i V/V	17 (73,9)	51 (81,0)	0,55	0,67 (0,22-2,05)
	M/M	6 (26,1)	12 (19,0)		
	V/V	5 (21,7)	26 (41,3)	0,13	0,40 (0,13-1,20)
	M/M i M/V	18 (78,3)	37 (58,7)		
	wt/F508del	2 (8,7)	3 (4,8)	0,61	1,90(0,30-12,20)
	wt/wt	21 (91,3)	60 (95,2)		
	wt/Q i Q/Q	1 (4,3)	4 (6,3)	1	0,67 (0,07-6,33)
	wt/wt	22 (95,7)	59 (93,7)		

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; K-kontrolna grupa; PK-pušačka kontrolna grupa; p-statistička značajnost; OR(CI)-eng. odds ratio (confidence interval); CYP-eng. Cytochrome; GST-glutation-S-transferaza; mEPHX-eng. Microsomal Epoxide Hydrolase; MMP-eng. Matrix Metalloproteinase; TNF α -eng. Tumor Necrosis Factor α ; CFTR-eng. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.

4.3. Funkcionalna analiza interakcije genske varijante C-1562T gena MMP9 i ekstrakta duvanskog dima

U ovom radu je utvrđeno da je učestalost heterozigotnih nosilaca varijante C-1562T gena MMP9 veća u grupi pacijenata (36%) u odnosu na kontrolne grupe K i PK (24% i 18%). Statistički značajna razlika je dobijena prilikom poređenja grupe pacijenata sa kontrolnom grupom PK (36,0% vs. 18%; OR=2,57 95%CI(1,10-5,98), p=0,03) (Tabela 16). Dobijeni rezultat ukazuje na potencijalnu ulogu varijante C-1562T u nastanku hronične opstruktivne bolesti pluća kod pušača. Pored istaknute uloge MMP9 u patogenezi HOBP, za varijantu C-1562T je poznato da dovodi do povećane transkripcione aktivnosti gena MMP9 *in vitro* (Zhang et al. 1999). Međutim, nije poznato kako komponente duvanskog dima utiču na njenu ekspresiju. Obzirom da je HOBP složeno oboljenje koje uključuje interakciju genetičkih i sredinskih faktora, opredelili smo se za proučavanje interakcije varijante C-1562T gena MMP9 i duvanskog dima.



Slika 30. Šematski prikaz redosleda eksperimenata u analizi interakcije varijante MMP9 C-1562T i duvanskog dima.

Funkcionalno ispitivanje interakcije polimorfne promotorske sekvence gena MMP9 i duvanskog dima vršeno je promotorskim esejima u sistemu sa dva luciferazna

reporter gena. Kao model sistem korišćena je ćelijska linija U937. Ćelije U937 su monociti, koji po diferencijaciji u makrofage predstavljaju glavni izvor MMP9 u plućima obolelih. Luciferaznim esejima prethodilo je kloniranje promotorskog regiona (od -2175 do +11) gena MMP9 u reporterski vektor pGL4.10 ispred gena za "firefly" luciferazu pri čemu je napravljen konstrukt pGL-pMMP9C. Varijanta -1562T je dobijena mutagenezom konstrukta pGL-pMMP9C. Interakcija varijante C-1562T gena MMP9 sa ekstraktom duvanskog dima praćena je merenjem aktivnosti luciferaza tranzijentno transfekovanih ćelija. Šematski prikaz redosleda eksperimenata funkcionalne analize interakcije varijante C-1562T i duvanskog dima prikazan je na Slici 30.

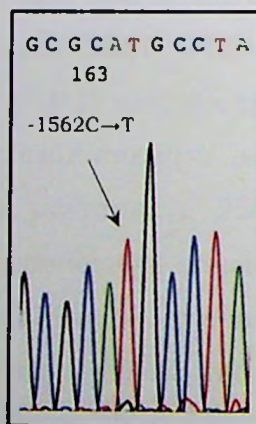
4.3.1. Kloniranje promotora MMP9 u pGL4.10 vektor i mutageneza konstrukta pGL-pMMP9

Promotorski region gena MMP9 (-2175/+11, ~2,2 kb), umnožen je u PCR reakciji prema uslovima prikazanim u Tabeli 4. Kao matrica, korišćena je DNK ispitanika za koju je ustanovljeno da nosi MMP9 -1562CC genotip. Nakon elektroforeze u 1% agaroznom gelu, PCR fragmenti promotora MMP9 su prečišćeni iz gela. Kloniranje promotora vršeno je u dva koraka. U prvom koraku prečišćenim PCR fragmentima najpre su dodati adeninski repići, a zatim su ligirani u vektor pGEM-T Easy. Kompetentne ćelije su transformisane ligacionom smešom i kultivisane na čvrstoj selektivnoj podlozi. Prisustvo inserta u pGEM-T Easy vektoru je potvrđeno digestijom plazmidne DNK enzimom *EcoRI* i elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Plazmidna DNK za koju je utvrđeno da nosi insert odgovarajuće dužine je sekvencirana. Sekvenciran je celokupni promotorski region gena MMP9. U reakcijama sekvenciranja, prikazanim u Tabeli 9, korišćeno je 6 oligonukleotida prikazanih u Tabeli 1. Odabran je klon za koji je ustanovljeno da ima wt sekvencu promotora, pGEM-pMMP9, i on je korišćen u daljem radu.

U drugom koraku, promotorski region MMP9 je iz vektora pGEM-T-easy prebačen u reporterski vektor pGL4.10. Ligaciji promotora MMP9 i vektora pGL prethodila je digestija DNK restrikcionim enzimima *XhoI* i *KpnI*, kako bi se dobili odgovarajući lepljivi krajevi vektora i inserta. Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje promotora gena MMP9, K5' i K3', sadrže na svojim krajevima sekvence koje odgovaraju mestima sečenja restrikcionih endonukleaza *XhoI* i *KpnI*. Izbacivanje

inserta iz konstrukta pGEM-pMMP9 vršeno je simultanom digestijom enzimima *XhoI* i *KpnI*, a insert je prečišćen iz gela nakon elektroforeze u 1% agaroznom gelu. Digestija vektora pGL vršena je restrikcijom enzimima *XhoI* i *KpnI* u pojedinačnim reakcijama, pošto su mesta prepoznavanja ovih enzima bliska, pa simultana digestija može umanjiti efikasnost reakcije. Nakon digestije, DNK je prečišćena, insert i vektor pGL4.10 su ligirani, a produkti ligacije su propagirani u bakterijama. Analizirano je nekoliko klonova iz kojih je izolovana plazmidna DNK, a prisustvo inserta u vektoru pGL je potvrđeno digestijom plazmidne DNK i elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Odabran je klon koji nosi konstrukt pGL-pMMP9C.

Plazmidna DNK odabranog klona je korišćena za mutagenezu uvođenjem bazne zamene -1562 C→T *in situ* PCR dirigovanom mutagenezom. Analiza klonova vršena je PCR-RFLP metodom koja se koristi za detekciju ove genske varijante u genomskoj DNK Tabele 4 i 5. Sekvenciranjem je potvrđeno da selektovani klon nema drugih promena u sekvenci, osim -1562T (Slika 31).

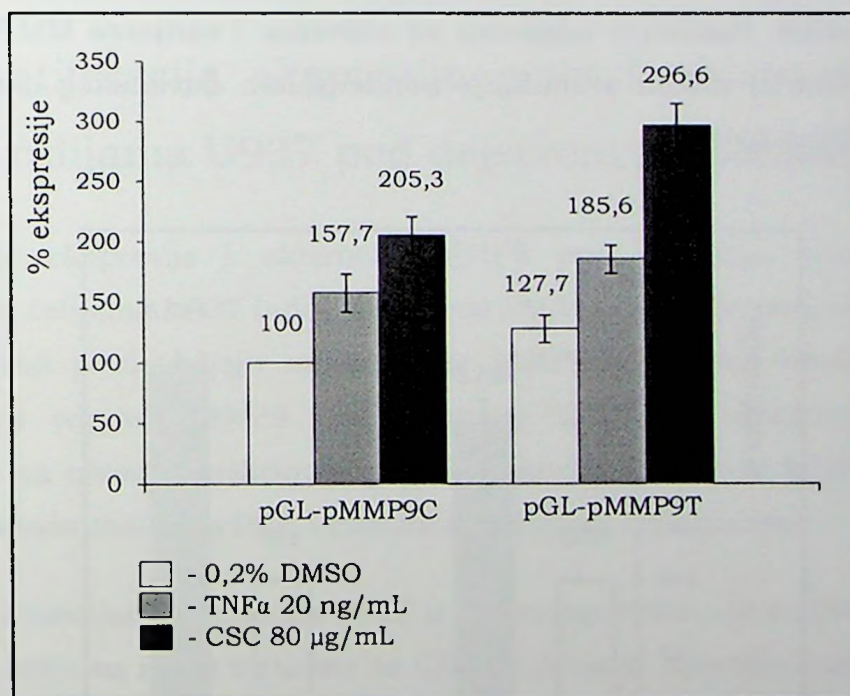


Slika 31. Elektroferogram dela sekvence konstrukta pGL-pMMP9T sa uvedenom mutacijom C→T na poziciji -1562.

Na taj način dobijen je konstrukt pGL-pMMP9T. Iz selektovanih klonova koji nose konstrukte pGL-pMMP9C i pGL-pMMP9T izolovana je plazmidna DNK koja je korišćena za transfekciju ćelija U937.

4.3.2. Analiza interakcije varijante C-1562T MMP9 i ekstrakta duvanskog dima u ćelijama U937

Za analizu interakcije genske varijante C-1562T gena MMP9 i duvanskog dima u ćelijama U937 korišćen je luciferazni esej. Ćelije su kotransfekovane sa prečišćenim konstruktima pGL-pMMP9C ili pGL-pMMP9T zajedno sa vektorom pRL-TK. Transfekovane ćelije su zatim tretirane sa 0,2% DMSO (negativna kontrola), 20 ng/mL TNF α (pozitivna kontrola) i 80 μ g/mL CSC. Nakon 24 sata ćelije su lizirane i merene su aktivnosti luciferaza. Luciferazne aktivnosti pGL-pMMP9C i pGL-pMMP9T vektora su normalizovane prema aktivnosti kontrolne "Renilla" luciferaze, eksprimirane sa pRL-TK vektora. Normalizovane aktivnosti konstrukata izražene su u odnosu na aktivnost pGL-pMMP9C konstrukta, koja je označena sa 100%. Na Slici 32 su prikazani rezultati četiri nezavisna eksperimenta, pri čemu je svaki urađen u triplikatu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM.



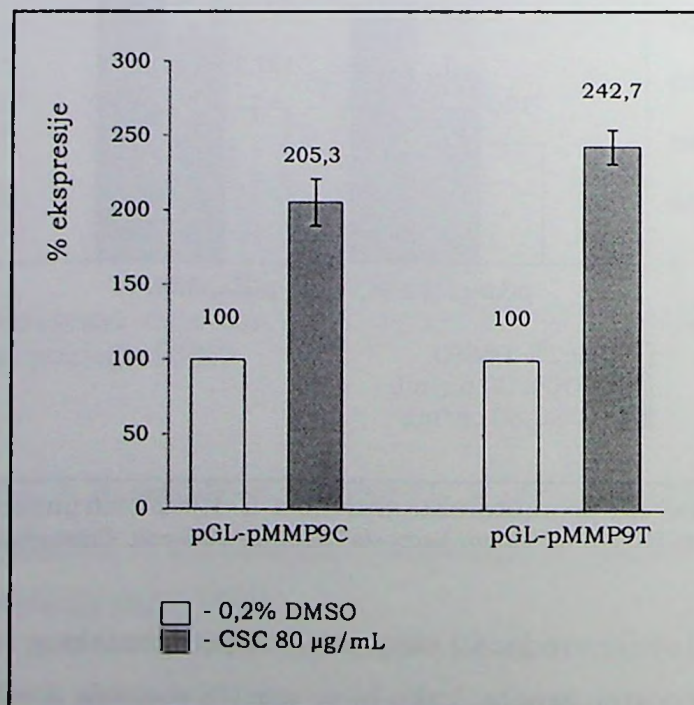
Slika 32. Uticaj CSC na promotorsku aktivnost C-1562T varijante gena za MMP9. DMSO-dimetil-sulfoksid; TNF α -eng. Tumor Necrosis Factor α ; CSC-eng. Cigarette Smoke Condensate.

Uobičajena normalizacija vrednosti ekspresije eksperimentalnog reporter gena vrši se sa kontrolnim reporter genom, kako bi se izbegla moguća greška usled različite efikasnosti transfekcije u različitim uzorcima. Ekspresija kontrolnog reportera, tj. "Renilla" luciferaze ne bi trebalo da varira kada se porede njene vrednosti u reakcijama kontrolnih tretmana (0,2% DMSO) i tretmana CSC (80 μ g/mL). U nekim

slučajevima kada je primećeno da u reakcijama tretmana sa CSC dolazi do povećanja vrednosti koje se očitavaju za "Renilla" luciferazu u odnosu na vrednosti za kontrolne tretmane, normalizacija vrednosti eksperimentalnog gen reportera tretiranog CSC vršena je prema vrednosti kontrolnog gen reportera kontrolnog tretmana (0,2% DMSO). Ovakav način obrade podataka, sugerisan je od strane tima iz Promega-e, obzirom da su transfekcione smeše pripremane u istoj epruveti za svaki od parova kotransfekovanih vektora pGL-pMMP9C i pGL-pMMP9T, kao i to da su rezultati dobijeni regularnom normalizacijom slični.

Razlika u promotorskim aktivnostima pGL-pMMP9C i pGL-pMMP9T varijanti je iznosila 100% prema 127,7%. U eksperimentu je kao pozitivna kontrola korišćen TNF α , koji dovodi do indukcije ekspresije MMP9 gena.

Nakon stimulacije pGL-pMMP9C konstrukta duvanskim dimom, promotorska aktivnost je sa 100% porasla na 205,3%, dok je u slučaju pGL-pMMP9T konstrukta sa bazičnih 127,7% povećana na 296,6%. U oba slučaja razlika je bila statistički značajna ($p < 0,005$). Razlika u odgovoru wt sekvence i varijante MMP9 promotora (205,3% vs. 296,6%) nakon stimulacije kondenzatom duvanskog dima je takođe statistički značajna ($p < 0,01$).



Slika 33. Razlika odgovora konstrukata pGL-pMMP9C i pGL-pMMP9T na dejstvo ekstrakta duvanskog dima u zavisnosti od prisustva varijante C-1562T u promotorskoj sekvenci MMP9 gena.

DMSO-dimetil-sulfoksid; CSC-eng. Cigarette Smoke Condensate.

Kako bi se bolje uočila razliku u povećanju promotorskih aktivnosti pGL-pMMP9C i pGL-pMMP9T vektora, do koje dolazi u prisustvu duvanskog dima, odgovori stimuliranih konstrukata su normalizovani prema vrednostima sopstvenih negativnih kontrola, tako što je osnovna aktivnost za oba konstrukta označena kao 100% (Slika 33). Odgovor wt varijante promotora je povećan dva puta nakon tretmana sa kondenzatom duvanskog dima, dok to povećanje kada je genska varijanta prisutna iznosi 2,4 puta.

Ovi rezultati jasno pokazuju da oba konstrukta, pGL-pMMP9C i pGL-pMMP9T, daju odgovor na dejstvo ekstrakta duvanskog dima. Međutim, postoji razlika u odgovoru na dejstvo ekstrakta duvanskog dima u zavisnosti od promotorske sekvence MMP9 gena. Varijanta -1562T u promotoru MMP9 dovodi do većeg povećanja promotorske aktivnosti u odnosu na varijantu -1562C nakon stimulacije duvanskim dimom.

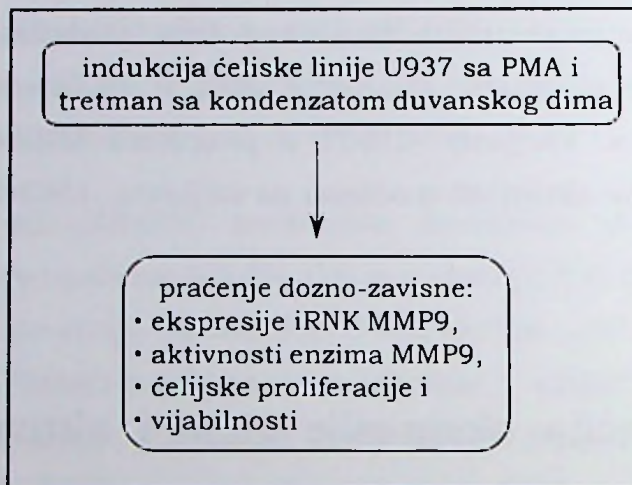
4.4. Kvantifikacija ekspresije gena i aktivnosti enzima MMP9 u ćelijama U937 pod dejstvom duvanskog dima

Kvantifikacija ekspresije i aktivnosti MMP9 pod dejstvom duvanskog dima određena je u ćelijama U937 indukovanim sa PMA u cilju diferencijacije monocita u makrofage, koji predstavljaju najveći izvor MMP9 u plućima obolelih od HOBP. Dozno-zavisni odgovor MMP9 pod dejstvom CSC, na indukovanim ćelijama analiziran je na nivou transkripcije gena i enzimske aktivnosti MMP9 pri čemu su korišćene metoda real-time PCR i metoda želatinskog zimograma.

Indukcija diferencijacije monocita U937 u makrofage vršena je sa 50 ng/mL PMA, a indukovane ćelije su zatim tretirane sa CSC. Iz ćelija je izolovana totalna RNK, koja je nakon prevođenja u cDNK korišćena za relativnu kvantifikaciju ekspresije metodom real-time PCR. Ispitivana je dozno-zavisna ekspresija MMP9 u zavisnosti od koncentracije CSC i određena je doza CSC koja dovodi do najsnažnije indukcije ekspresije gena MMP9 u ćelijama U937.

Kondicionirani medijumi, tj medijumi u kojima su gajene indukovane i tretirane U937 ćelije, korišćeni su za analizu enzimske aktivnosti MMP9 metodom želatinskog zimograma. Jednostavan način analize enzimske aktivnosti moguć je

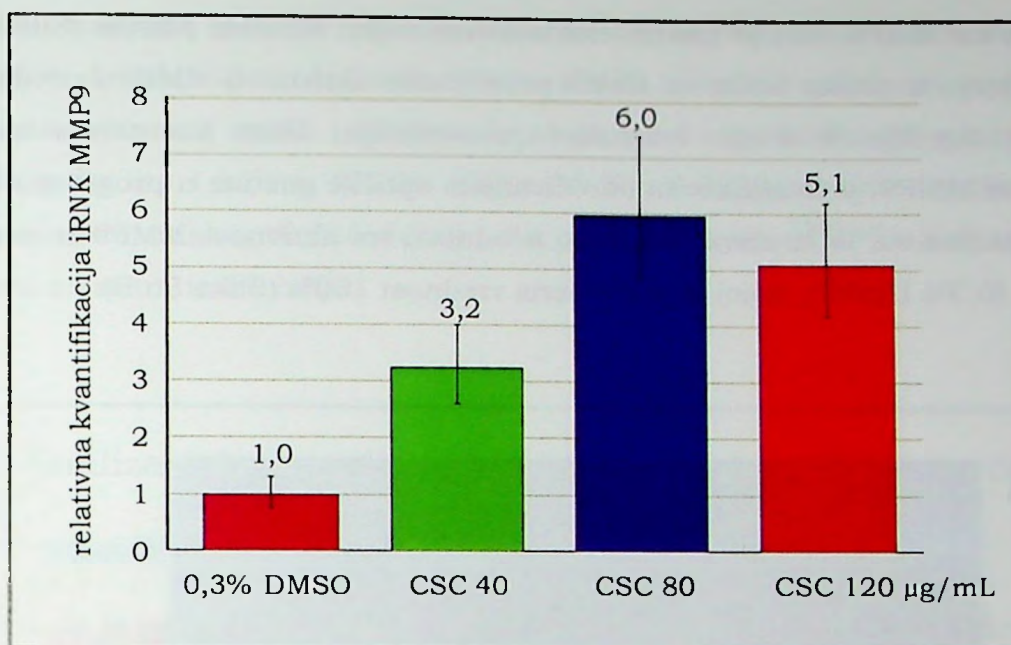
obzirom da je MMP9 ekskretorni enzim i nakon sinteze u ćelijama biva oslobođen u medijum u formi pro-enzima. Pro-MMP9 svoju enzimsku aktivnost ispoljava na želatinu u poliakrilamidnom gelu nakon inkubiranja u puferu koji omogućava aktivnost pro-enzima. Metodom želatinskog zimograma određena je dozno-zavisna aktivnost MMP9 u zavisnosti od koncentracije CSC i određena je doza CSC koja dovodi do maksimalne enzimске aktivnosti MMP9 na indukovanim ćelijama U937. Šematski prikaz eksperimentalnog pristupa dat je na Slici 34.



Slika 34. Šematski prikaz eksperimenata za kvantifikaciju ekspresije MMP9 na nivou iRNK i proteina.

4.4.1. Relativna kvantifikacija ekspresije gena MMP9 metodom real-time PCR

Rezultati relativne kvantifikacije gena MMP9 u ćelijama linije U937 indukovanim sa PMA i tretiranim sa ekstraktom duvanskog dima su prikazani na Slici 35. Ćelije su bile tretirane sa 40, 80 i 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CSC. Kao endogena kontrola korišćen je gen GAPDH, na čiju ekspresiju, koliko je poznato iz literature, ne utiče tretman sa ekstraktom duvanskog dima. Kao kalibrator korišćen je uzorak ćelija tretiranih sa 0,3% DMSO. Kalibratoru je dodeljena vrednost 1. Rezultati dobijeni za uzorke tretirane ekstraktom duvanskog dima su izraženi u odnosu na vrednosti dobijene za kalibrator. Dobijeni rezultati su analizirani 7500 System Software-om i prikazani na Slici 35, i predstavljaju srednju vrednost dobijenu u tri nezavisna eksperimenta urađena u triplikatu.



Slika 35. Relativna kvantifikacija ekspresije MMP9 u ćelijama U937 indukovanim sa PMA i tretiranim CSC.

DMSO-dimetil-sulfoksid; CSC-eng. Cigarette Smoke Condensate.

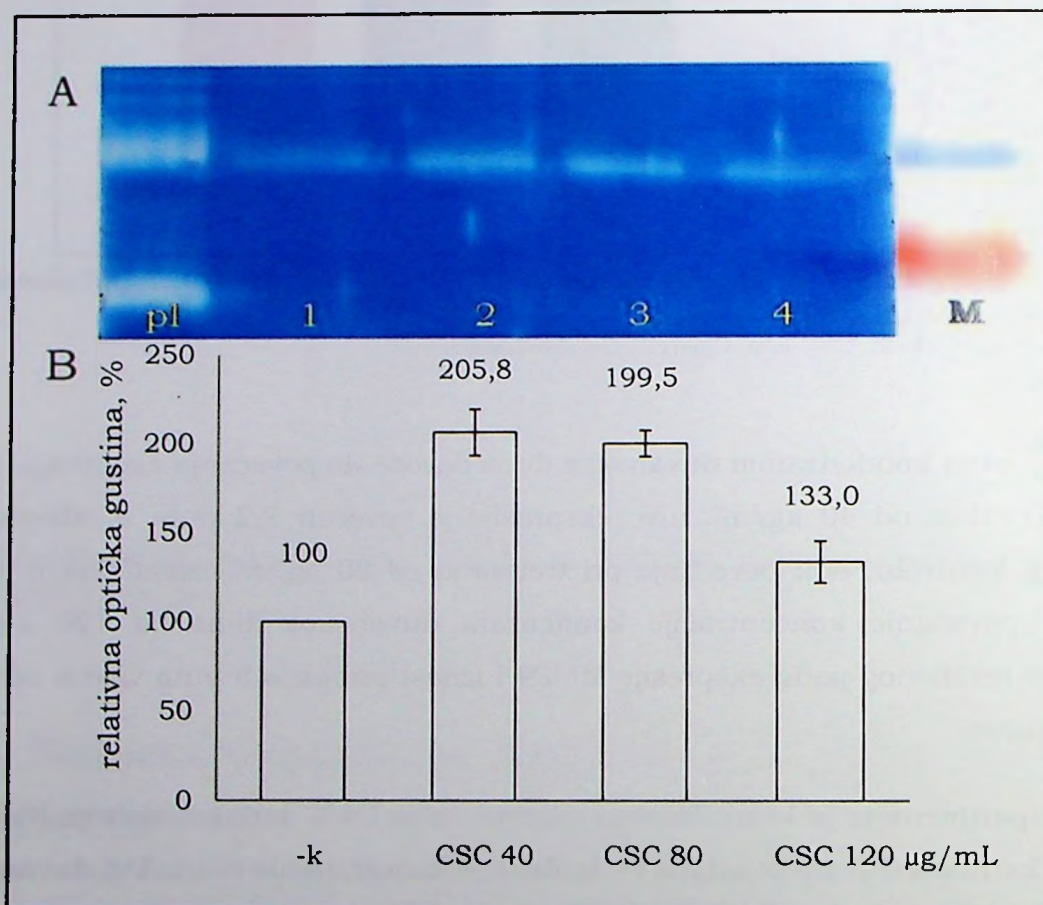
Tretmani ćelija kondenzatom duvanskog dima dovode do povećanja ekspresije gena MMP9. Pri dozi od 40 µg/mL nivo ekspresije je povećan 3,2 puta u odnosu na negativnu kontrolu, dok povećanje pri tretmanu od 80 µg/mL iznosi čak 6 puta. Dodatno povećanje koncentracije kondenzata duvanskog dima od 120 µg/mL dovodi do relativnog pada ekspresije MMP9 i iznosi približno 5 puta više u odnosu na kalibrator.

Ovim eksperimentom je kvantifikovan odgovor ćelija U937 indukovanih sa PMA na dejstvo ekstrakta duvanskog dima i određena je koncentracija ekstrakta duvanskog dima, od 80 µg/mL, na kojoj je gen MMP9 maksimalno indukovano.

4.4.2. Kvantifikacija ekspresije proteina MMP9 merenjem enzimske aktivnosti metodom želatinskog zimograma

Kvantifikacija ekspresije gena MMP9 vršena je posredno, merenjem enzimske aktivnosti sekretovane MMP9 u kondicioniranim medijumima ćelija indukovanih PMA i tretiranih sa 40, 80 i 120 µg/mL CSC. Medijumi su sakupljeni 24 sata nakon tretmana. Proteini kondicioniranih medijuma su razdvajani elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu kopolimerisanim sa želatinom, koji predstavlja

supstrat za MMP9. Gel je nakon elektroforeze bojen Komasi plavim (Slika 36 A). Prosvetljenja u obliku traka su mesta proteinazne aktivnosti MMP9 i predstavljaju rezultat digestije želatina. Intenzitet prosvetljenja, uzet kao mera enzimske aktivnosti MMP9, je kvantifikovan određivanjem optičke gustine u programu ImageJ. Aktivnost enzima je izražena relativno u odnosu na aktivnost MMP9 u negativnoj kontroli (0,3% DMSO), kojoj je pridružena vrednost 100% (Slika 36 B).



Slika 36. Kvantifikacija ekspresije proteina MMP9 u ćelijama U937 u prisustvu ekstrakta duvanskog dima. A: pl-humana plazma (pozitivna kontrola), ležište 1-negativna kontrola (0,3% DMSO), ležišta 2-4, kondicionirani medijumi ćelija tretiranih sa 40, 80 i 120 µg/mL CSC i M-bojeni marker (Fermentas, plava traka-100 kDa, i crvena traka-70 kDa); B: kvantifikacija rezultata. CSC-eng. Cigarette Smoke Condensate.

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Na grafiku su sumirani rezultati tri nezavisna eksperimenta. Rezultati kvantifikacije su pokazali da je aktivnost sekretovane MMP9 u medijumu u kome su gajene ćelije U937, indukovane sa PMA i tretirane sa 40 i 80 µg/mL kondenzata duvanskog dima slična i približno iznosi 200% u odnosu na negativnu kontrolu. Ova razlika je

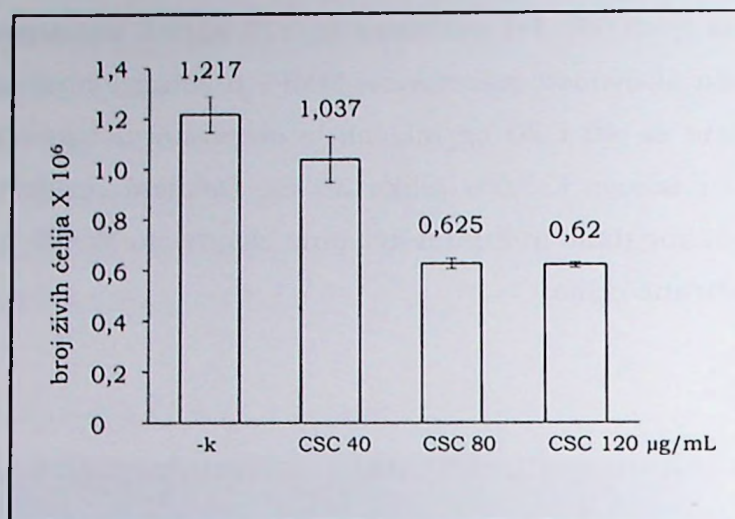
statistički značajna ($p < 0,05$). Pri tretmanu sa 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kondenzata duvanskog dima dolazi do pada aktivnosti sekretovane MMP9 u kondicioniranom medijumu u odnosu na tretmane sa 40 i 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ali je povećanje u odnosu na negativnu kontrolu prisutno i iznosi 133,0% (Slika 36 B). Dobijeni rezultati pokazuju da komponente duvanskog dima indukuju dva puta ekspresiju MMP9 u ćelijama U937 u odnosu na netretirane ćelije.

4.4.3. Analiza toksičnosti ekstrakta duvanskog dima na ćelijama U937

Sobzirom da je primećeno smanjenje ekspresije MMP9 u ćelijama tretiranim višim dozama CSC (120 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ispitali smo i uticaj ekstrakta duvanskog dima na proliferaciju i vijabilnost ćelija U937 tretiranih duvanskim dimom. Navedeni parametri su analizirani brojanjem ćelija nakon bojenja tripan plavim i MTT testom.

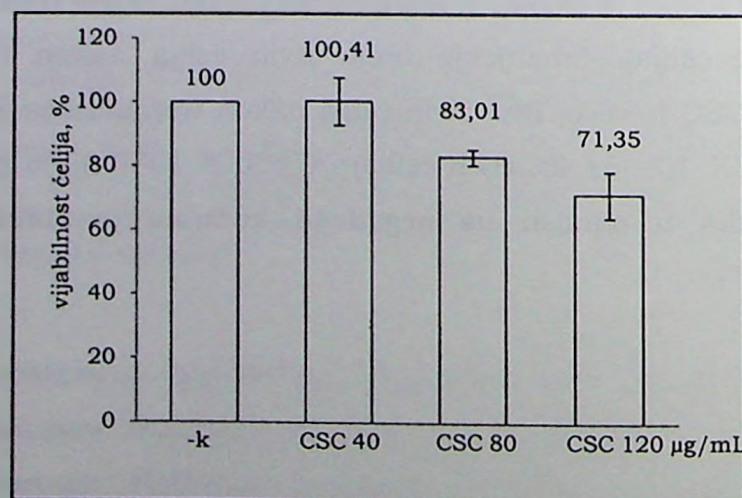
Ćelije U937, indukovane sa PMA i tretirane sa 40, 80 i 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CSC su korišćene za analizu ćelijske proliferacije. Nakon 24 sata od tretmana, vršeno je bojenje ćelija tripan plavim i brojanje živih ćelija. Na Slici 37, broj živih ćelija u različitim uzorcima je izražen kao srednja vrednost \pm SEM za tri nezavisna eksperimenta.

Broj ćelija koje su preživele tretman sa 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CSC je smanjen sa $1,217 \times 10^6$ (100% živih ćelija) koliko je iznosio u kontrolnom uzorku (0,3% DMSO), na $1,037 \times 10^6$ (85,2% živih ćelija). Smanjenje broja živih ćelija nakon tretmana višim koncentracijama CSC je veće. Broj živih ćelija nakon tretmana sa 80 i 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CSC iznosi $0,625 \times 10^6$ (51,4% živih ćelija) i $0,620 \times 10^6$ (50,9% živih ćelija), a u oba slučaja razlika u odnosu na negativnu kontrolu je statistički značajna ($p < 0,005$) (Slika 37).



Slika 37. Esej ćelijske proliferacije bojenjem tripan plavim. Indukovane ćelije U937 tretirane sa rastućim količinama CSC.
CSC-eng. Cigarette Smoke Condensate.

Analiza vijabilnosti ćelija vršena je MTT testom. Ćelije U937 su indukovane sa PMA i tretirane sa 40, 80 i 120 µg/mL CSC. U kontrolnom uzorku ćelije su gajene u prisustvu 0,3% DMSO. Rezultati kolorimetrijskih merenja su prikazani na Slici 38. Izraženi su u odnosu na kontrolu kojoj je pridružena vrednost 100% i predstavljeni su kao srednja vrednost ± SEM za tri nezavisna eksperimenta urađena u triplikatu. Rezultati pokazuju da tretman ćelija sa 40 µg/mL CSC ne dovodi do smanjenja njihove vijabilnosti u poređenju sa kontrolnim, netretiranim ćelijama. Smanjenje ćelijske vijabilnosti na 83,0% uočava se pri tretmanu ćelija sa 80 µg/mL CSC, odnosno na 71,3% pri tretmanu ćelija sa 120 µg/mL CSC. U oba slučaja razlika je statistički značajna ($p=0,0001$).



Slika 38. MTT esej ćelijske vijabilnosti indukovane U937 linije tretirane sa rastućim količinama CSC.
CSC-eng. Cigarette Smoke Condensate.

Rezultati MTT eseja pokazuju značajno smanjenje vijabilnosti ćelija tretiranih sa 80 i 120 $\mu\text{g/mL}$ ekstrakta duvanskog dima. Može se smatrati da se smanjenje ćelijske vijabilnosti na 60-90% javlja pri blagom citotoksičnom dejstvu ispitivanog tretmana (Lönnroth 2005). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da doze CSC od 80 i 120 $\mu\text{g/mL}$ imaju blagi citotoksični efekat na ćelije U937.

5. Diskusija

I pored velikog broja asocijativnih studija u kojima je identifikovana povezanost određenih genskih varijanti gena kandidata sa HOBP, dobijeni rezultati su nekonzistentni. U najvećem broju studija, uočene statistički značajne asocijacije genetičkih varijanti i HOBP nisu potvrđene narednim istraživanjima (Hersh et al. 2005). Nekonzistentni rezultati su relativno čest problem u izučavanju kompleksnih bolesti poput HOBP, a proističu iz: genetičke heterogenosti različitih populacija, fenotipskih razlika ispitivanih grupa (to se prevashodno odnosi na kriterijume prilikom selekcije pacijenata i kontrolnih subjekata), populacione stratifikacije, male veličine grupe i dr. (Silverman 2006). Jedan deo ove teze čini upravo asocijativna studija gena kandidata u patogenezi HOBP, pa će u daljem tekstu biti detaljno analizirani i diskutovani naši rezultati dobijeni u studiji gena kandidata u srpskoj populaciji obolelih od HOBP.

Istraživanje je obuhvatilo 86 pacijenata obolelih od HOBP i kontrolnu grupu koja se sastojala od 50 nepušača i 50 pušača sa normalnom plućnom funkcijom. Izbor pacijenata koji je uključen u analizu je važan preduslov za uspešnu detekciju genetičkih asocijacija. Prisustvo heterogenih fenotipova u ispitivanim grupama može uticati na identifikaciju genetičkih faktora i dovesti do lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata. Iz tog razloga u ovoj studiji su korišćeni dobro okarakterisani pacijenti, dijagnostikovani prema svim kriterijumima Evropskog respiratornog društva (GOLD 2006). Svi subjekti sa astmom, malignim bolestima, bronhiektazijama i drugim teškim bolestima koje su udružene sa bolestima pluća bili su isključeni iz analize. Takođe je uloženi trud da se svi subjekti kontrolne grupe definišu za iste karakteristike i kliničke parametre kao i pacijenti, čime su uključeni samo subjekti sa normalnom funkcijom pluća, kod kojih je prisustvo plućnih bolesti isključeno, i koji potiču sa istog geografskog područja kao i pacijenti. Dobro odabrane i okarakterisane grupe ispitanika su od posebnog značaja, pošto su u brojnim asocijativnim studijama HOBP, korišćene kontrolne grupe sastavljene od subjekata iz opšte populacije bez podataka o funkciji pluća (Gaspar et al. 2004, Zidzik et al. 2008). Pušački status kontrolnih subjekata u našoj studiji je takođe bio precizno definisan, za razliku od objavljenih studija u kojima kontrolne grupe nemaju definisane parametre pušačkog statusa (Schirmer et al. 2009).

U ovoj studiji distribucija alelskih, pojedinačnih i složenih genotipskih učestalosti kod obolelih od HOBP je poredena sa kontrolnom grupom K (50 pušača i 50 nepušača) i grupom pušača PK (50 pušača) sa normalnom funkcijom pluća.

Poređenjem podataka između grupe pacijenata i kontrolne grupe K, ustanovljeno je da postoji statistički značajna razlika u pušačkom statusu među ovim grupama (72,1% vs. 50,0%). Ova razlika je proistekla iz teškoće u pronalaženju većeg broja pušača sa normalnom funkcijom pluća što je bio jedan od zahteva našeg dizajna studije. Kako bi faktor pušenja, kao najvažniji faktor rizika za pojavu HOBP, uključili u našu analizu, grupu obolelih smo poredili sa kontrolnom grupom PK koja se sastoji od 50 rezistentnih pušača, tj. pušača sa normalnom funkcijom pluća. Na taj način bili smo u mogućnosti da identifikujemo genetičke faktore koji u interakciji sa duvanskim dimom predstavljaju faktore rizika za pojavu bolesti.

Patogenezu HOBP karakteriše neravnoteža oksidanti-antioksidanti, proteinaze-antiproteinaze, izražena inflamacija, kao i poremećen mukocilijarni klirens (Sampsonas et al. 2006, Tzortzaki et al. 2006). Naša studija je sprovedena sa ciljem da ispita vezu odabranih, funkcionalnih varijanti gena uključenih u pomenute procese sa HOBP.

5.1. Udruženost varijanti gena uključenih u ravnotežu oksidanti-antioksidanti sa patogeneзом HOBP

Pluća predstavljaju prvi organ u kome toksična jedinjenja iz vazduha ostvaruju svoje dejstvo. Među jedinjenjima koja potiču iz životne sredine i unose se inhalacijom spadaju: PAU, aromatični amini, halogena i alifatična jedinjenja, epoksidi i dr. (Castell et al. 2005). Mnoge od ovih supstanci mogu se naći u značajnim koncentracijama u duvanskom dimu i zagađenom vazduhu u blizini industrijskih zona. Kada se ova jedinjenja nađu u respiratornom traktu, mogu biti apsorbovana i mogu interagovati sa ćelijama pluća i ostvariti pneumotoksično i kancerogeno dejstvo. Mehanizam kojim ksenobiotici dovode do oštećenja plućnog tkiva je složen, obzirom da pluća sadrže više od 40 različitih tipova ćelija. Najosetljivije ćelije pluća na dejstvo toksičnih supstanci su endotelijalne ćelije, alveolarni makrofazi, Klara ćelije, trepljaste epitelijalne ćelije i pneumocite tipa I i II (Castell et al. 2005). Pluća su sposobna da metabolišu mnoga strana jedinjenja

putem metabolizma ksenobiotika koji omogućava njihovu bioaktivaciju, detoksifikaciju i eliminaciju (Castell et al. 2005). Tokom bioaktivacije mogu nastati veoma reaktivni intermedijeri koji predstavljaju izvor oksidativnog stresa. Oksidativni stres, koji ima važnu ulogu u patogenezi HOBP, takođe potiče i od makrofaga, leukocita i epitelijalnih ćelija koje oslobađaju RKV. Neravnoteža oksidanati-antioksidanati dovodi do oksidativne inaktivacije antiproteinaza, oksidativnog oštećenja komponenti međućelijskog matriksa, poput elastina i kolagena, i indukcije ekspresije proinflamatornih gena što rezultira povećanjem inflamacije i oštećenjem plućnog tkiva, procesa koji karakterišu HOBP (MacNee 2000).

U ovoj studiji izučavane su odabrane funkcionalne varijante gena koji su uključeni u ksenobiotički metabolizam i odbranu od oksidativnog stresa, obzirom da njihovo prisustvo može dovesti do poremećaja ravnoteže oksidanti-antioksidanti i povećanog oksidativnog stresa koji predstavlja glavnu odliku HOBP.

5.1.1. Genske varijante citohroma 1A1 *1A/*2A i 2E1 *1A/*5B

CYP1A1 je uključen u bioaktivaciju PAU koji su u visokoj koncentraciji prisutni u duvanskom dimu. Ranije je pokazano da prisustvo CYP1A1 *2A alelske varijante, koja ima veći kapacitet metabličke aktivacije PAU iz duvanskog dima, može biti povezano sa plućnim karcinomom u japanskoj populaciji (Kawajiri et al. 1990). Pored toga u studiji sprovedenoj u populaciji belaca uočena je korelacija CYP1A1 *1A/*2A genotipa sa zajedničkim prisustvom emfizema i plućnog karcinoma (Cantlay et al. 1995). Međutim, u drugim studijama sprovedenim na populacijama belaca i Japanaca uloga ove varijante u patogenezi HOBP nije potvrđena (Budhi et al. 2003, Gaspar et al. 2004). Rezultati dobijeni u našoj studiji pokazali su sličnu distribuciju heterozigotnih nosilaca varijante CYP1A1 *2A u grupi pacijenata sa HOBP (18,6%) i kontrolnoj grupi (17,0%). Udruženost varijante CYP1A1 *2A sa HOBP u našoj studiji nije detektovana, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima u studiji sprovedenoj u Brazilu (Gaspar et al. 2004). Takođe nije ustanovljena modulatorna uloga varijante CYP1A1 *2A u nastanku težih oblika HOBP ili pojavi bolesti pre 40. godine života.

Ekspresija gena CYP1A1 može biti indukovana, i stoga zavisi od dijete, stila života i izloženosti toksičnim supstancama. Enzim CYP1A1 je uključen u aktivaciju PAU pri

čemu nastaju veoma reaktivni intermedijeri, a prisustvo varijante CYP1A1 *2A favorizuje ovu reakciju i može dovesti do akumulacije reaktivnih produkata, što ukazuje na individualnu različitost u toksičnom dejstvu ksenobiotika. Kinetika reakcija ksenobiotičkog metabolizma zavisi i od aktivnosti enzima faze II detoksifikacije, i ukoliko je njihova aktivnost dovoljna, aktivirani inermedijeri neće ostvariti toksičan efekat. Ovo može objasniti nedostatak povezanosti pojedinačne varijante CYP1A1 *2A sa HOBP, koji je potvrđen ne samo u našoj već i u studiji Gaspar-a i saradnika. Stoga se očekuje da pored prisustva varijante CYP1A1 *2A, prisustvo dodatnih varijanti u genima koji umanjuju efikasnost faze II detoksifikacije može dovesti do značajnijeg oksidativnog dejstva, o čemu će biti reči kasnije.

CYP2E1 je uključen u metabolizam kancerogenih nitrozamina iz duvanskog dima. Zastupljenost alela CYP2E1 *5B varira i iznosi 2% u populaciji belaca, 2-5% kod Afro-Amerikanaca i 24-27% kod Japanaca (Kato et al. 1992). U našoj kontrolnoj populaciji učestalost alela CYP2E1 *5B iznosi 2,5%, što je u skladu sa publikovanim rezultatima, dok kod obolelih iznosi 1,7%. Međutim, učestalost alela CYP2E1 *5B u kontrolnoj grupi PK iznosi 4%, pri čemu su detektovana dva heterozigotna i jedan homozigotni nosilac mutiranog alela. Obzirom da za dobijenu frekvencu alela CYP2E1 *5B, prisustvo homozigotnih nosilaca nije očekivano, distribucija ove varijante nije u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži ($p < 0,05$; $\chi^2 = 11,48$, za $d=1$). Odsustvo Hardy-Weinberg-ove ravnoteže u kontrolnoj grupi može proizaći iz greške u genotipizaciji, inbridinga ili populacione stratifikacije (Silverman et al. 2000). Obzirom da su rezultati naše studije regenotipizovani, prvi razlog možemo isključiti. Inbriding i populacionu stratifikaciju takođe možemo eliminisati, pošto analizirani subjekti kontrolnih grupa, K i PK, nisu u srodstvu i potiču sa istog geografskog područja kao i pacijenti. Međutim, kontrolna grupa PK predstavlja selektovanu kontrolnu grupu, jer uključuje subjekte koji su rezistentni na dejstvo duvanskog dima. Odsustvo Hardy-Weinberg-ove ravnoteže zapravo ukazuje na povezanost datog alela sa određenom karakteristikom grupe što u ovom slučaju predstavlja očuvanost normalne funkcije pluća kod pušača.

U prvim funkcionalnim analizama ustanovljeno je da alel CYP2E1 *5B ima povećanu ekspresiju u odnosu na wt alel (Hayashi² et al. 1991, Watanabe et al. 1994). Međutim, u kasnijim studijama, alel CYP2E1 *5B je povezan sa redukovanom aktivnošću i inducibilnošću enzima CYP2E1 (Marchand et al. 1999, Kato et al. 2003, Huang et al. 2003). Obzirom da ovaj enzim produkuje RKV i u

odsustvu supstrata, njegova smanjena ekspresija bi kod pušača mogla da ima protektivnu ulogu. Time bi moglo da se objasni odsustvo Hardy-Weinberg-ove ravnoteže u kontrolnoj grupi PK, tj. protektivna uloga alela CYP2E1 *5B kod pušača sa normalnom funkcijom pluća, obzirom da se za učestalost alela CYP2E1 *5B od 0,04, ne očekuje prisustvo jednog homozigota, kao što je detektovano u kontrolnoj grupi PK.

Uloga genske varijante CYP2E1 *5B je intenzivno proučavana usled njene moguće povezanosti sa različitim tipovima karcinoma i alkoholizmom. U studijama izvedenim u Brazilu i Indiji ustanovljena je udruženost alela CYP2E1 *5B sa HOBP, dok u studiji u Rusiji ta veza nije potvrđena (Korytina et al. 2005, Gaspar et al. 2004, Arif et al. 2007). U našoj studiji takođe nije pokazana povezanost ove genske varijante kako sa patogenezom tako ni sa modulacijom HOBP.

5.1.2. Genske varijante glutation-S-transferaza M1, T1 i P1

Iako klasa enzima GST ima ključnu ulogu u procesima biološke detoksifikacije, dva najrelevantnija izoenzima GSTM1 i GSTT1 su u velikom procentu populacije deletirani. U populaciji belaca, učestalost homozigotne delecije za GSTM1 -/- iznosi oko 50%, a za GSTT1 -/- oko 20% (Bolt et al. 2006). Rezultati dobijeni u našoj kontrolnoj grupi su u skladu sa pomenutim rezultatima, i iznose za GSTM1 -/- 47,0%, a za GSTT1 -/- 24,0%. Grupu pacijenata karakterišu slične učestalosti, za GSTM1 -/- 59,3%, a za GSTT1 -/- 24,4%, a poređenjem sa kontrolnom grupom nije ustanovljena statistički značajna razlika u njihovoj distribuciji. U našoj studiji uloga genotipova GSTM1 -/- i GSTT1 -/- u pojavi težeg oblika HOBP ili ranijoj pojavi bolesti takođe nije uočena. U dosadašnjim studijama ustanovljena je udruženost GSTM1 -/- genotipa sa emfizemom kod pacijenata sa plućnim karcinomom i teškim hroničnim bronhitisom kod pušača (Tzortzaki et al. 2006). U studiji sprovedenoj na Tajvanu takođe je potvrđena uloga genotipa GSTM1 -/- u razvoju HOBP kao i njegova udruženost sa teškom HOBP ($FEV_1 < 35\%$ od predviđene vrednosti) kod pušača (Cheng et al. 2004). Nasuprot tome, studije sprovedene u Brazilu, Koreji, Turskoj, kao i naša studija, nisu ustanovile vezu genotipova GSTM1 -/- i GSTT1 -/- sa HOBP (Gaspar et al. 2004, Yim et al. 2000, Calikoglu et al. 2006). Međutim, u jednoj obimnoj studiji koja je pratila 4686 ispitanika tokom 11 godina uočena je povezanost genotipa GSTT1 -/- sa progresivnim padom FEV_1

vrednosti kod muškaraca, nezavisno od pušačkog statusa (Imboden et al. 2007). Ovaj rezultat se može objasniti ulogom različitih genetičkih i sredinskih faktora u patogenezi ove bolesti u različitim populacijama.

Gen za GSTP1 je od svih GST gena najviše eksprimiran u plućnim makrofazima i epitelu bronhiola i alveola, tako da predstavlja glavni GST izoenzim uključen u lokalnu detoksifikaciju u plućima. Pokazano je da alel 105Ile (wt) ispoljava slabiju katalitičku efikasnost prema aromatičnim epoksidima u poređenju sa alelom 105Val, tj. ima manji kapacitet detoksifikacije ksenobiotika iz duvanskog dima (Sundberg et al. 1998). Sa druge strane, ustanovljeno je da alel 105Val ima manju konjugacionu aktivnost prema 1-hloro-2,4-dinitrobenzenu (Watson et al. 1998). Učestalost alela 105Val u populaciji belaca iznosi 0,33 što je u skladu sa učestalošću od 0,32 u našoj kontrolnoj grupi. U našoj studiji, distribucija alela i genotipova varijante Ile105Val kod obolelih od HOBP je bila slična kao i u kontrolnoj grupi, tj. nije ustanovljeno da ispitivana GSTP1 varijanta može biti povezana sa nastanakom bolesti. U pogledu uloge genske varijante Ile105Val u nastanku HOBP u literaturi postoje kontraverzni rezultati. Calikoglu-a i saradnici su u studiji sprovedenoj na turskoj populaciji ustanovili da alel 105Val ima protektivnu ulogu u nastanku HOBP, dok u studiji Vibhuti-a i saradnika, sprovedenoj u Indiji, isti alel predstavlja statistički značajan faktor rizika za pojavu bolesti i povezan je sa značajnim povećanjem malondialdehida (produkt peroksidacije lipida) i smanjenjem nivoa glutaciona u plazmi (Calikoglu et al. 2006, Vibhuti et al. 2007). U studiji sprovedenoj u Japanu ustanovljena je asocijacija genotipa 105IleIle sa bolešću (Ishii et al. 1999). Rezultati dobijeni u našoj studiji nisu potvrdili ulogu genske varijante Ile105Val u patogenezi HOBP, što je u skladu sa rezultatima drugih studija (Gaspar et al. 2004, Cheng et al. 2004, Korytina et al. 2005). Studija u kojoj su praćeni parametri funkcije pluća u opštoj populaciji takođe nije pokazala uticaj varijante Ile105Val na pad funkcije pluća (Imboden et al. 2007). Takođe, u našoj studiji nije uočena asocijacija GSTP1 Ile105Val sa pojavom težeg oblika HOBP ili ranijom pojavom bolesti.

5.1.3. Genske varijante mikrozomalne hidrolaze epoksida S i F

Gen za mEPHX kodira enzim koji katalizuje hidrolizu arena i alifatičnih epoksida u manje reaktivne dihidrodiole koji su rastvorljivi u vodi. U okviru gena mEPHX

detektovane su dve varijante, alel S (Tyr113His) i alel F (His139Arg). Distribucija analiziranih alela i genotipova u ovoj studiji nije pokazala udruženost sa pojavom HOBP. Intresantno je da je u kontrolnoj grupi detektovano 5 nosilaca genotipa F/F, dok u grupi obolelih nosioci genotipa F/F nisu detektovani. Mada razlika u distribuciji genotipa F/F nije statistički značajna, odsustvo genotipa F/F u grupi pacijenata ukazuje na važnost brzog delovanja enzima mEPHX i prevenciju oksidativnog oštećenja, obzirom da prisustvo alela F dovodi do povećanja enzimske aktivnosti od 25% (Hassett et al. 1994). U našoj studiji je uočena snižena učestalost alela F kod podgrupe pacijenata sa teškim oblikom bolesti u odnosu na one koji imaju lakši oblik HOBP (25,0% vs. 46,7%; OR=0,38, p=0,054). Mada u ovom slučaju p vrednost pokazuje graničnu vrednost, OR ukazuju na protektivnu ulogu ovog alela od 2,6 puta za razvoj teške ili veoma teške HOBP. Ova dva rezultata ukazuju na trend nedostatka mEPHX aktivnijeg alela (F) kod obolelih u odnosu na kontrolne ispitanike, kao i kod bolesnika sa težim stadijumom bolesti. Sličan rezultat dobijen je u studiji Cheng-a i saradnika koji su ustanovili da pušači sa HOBP, nosioci genotipa S/S, imaju veći faktor rizika za nastanak težeg oblika ove bolesti (Cheng et al. 2004). Iz tog razloga potrebno je dodatno ispitati njegovu ulogu na većem broju obolelih.

U studiji u kojoj je analizirana škotska populacija ustanovljeno je da homozigotni nosioci alela S imaju povećani rizik za pojavu HOBP i emfizema (Smith et al. 1997). Studija koja je sprovedena u Indiji pokazala je statistički značajno povećanu frekvencu alela S kod obolelih od HOBP i alela F kod kontrolnih subjekata (Vibhuti et al. 2007). U istoj studiji je pokazano da prisustvo alela S korelira sa značajnim padom FEV₁ vrednosti, povećanjem malonaldehida i smanjenjem glutaciona u plazmi. Studija koja je izvedena u Japanu je ustanovila povezanost istog genotipa sa težim oblikom HOBP (Yoshikawa et al. 2000). Ovo se može objasniti time da dugotrajno prisustvo epoksida u respiratornom traktu, usled smanjene aktivnosti mEPHX, što iznosi 40% kada je prisutan alel S, može dovesti do povećanog oštećenja tkiva i inflamacije. Prisustvo alela S je takođe povezano sa smanjenim kapacitetom fizičke aktivnosti, dok je alel F udružen sa relativno dobrom gasnom razmenom (Wood et al. 2006).

5.2. Udruženost varijanti gena uključenih u ravnotežu proteinaze-antiproteinaze sa patogenezom HOBP

Međućelijski matriks čini složena mreža, sastavljena od proteina i proteoglikana, koja održava integritet tkiva. Sastav međućelijskog matriksa je rezultat ravnoteže sinteze i degradacije njegovih strukturnih komponenti. Stalno remodelovanje i reparacija međućelijskog matriksa omogućeno je velikim brojem degradativnih enzima koji uključuju familiju metaloproteinaza matriksa. Pored deficijencije α_1 AT, specifičnog inhibitora elastaze neutrofila, poznato je da plućni emfizem karakteriše povećana produkcija enzima sa elastolitičkom i kolagenolitičkom aktivnošću (Finlay et al. 1997). Narušena ravnoteža proteinaze-antiproteinaze kod obolelih od HOBP, dovodi do povećane razgradnje komponenti međućelijskog matriksa poput kolagena, elastina, bazalne membrane, laminina i fibronektina. Usled razgradnje plućnog parenhima i gubitka plućne elastičnosti, okolno tkivo postaje osetljivije na dejstvo toksičnih materija i oksidativni stres. Rezultati studija sprovedenih na životinjskom modelu su takođe potvrdili ulogu metaloproteinaza matriksa u respiratornoj inflamaciji indukovanoj pušenjem i nastanku emfizema (D'Armiento et al. 1992, Lanone et al. 2002, Hautamaki et al. 1997). Stoga smo u našem istraživanju, pored varijanti gena α_1 AT, ispitivali ulogu promotorskih varijanti, koje dovode do promena u ekspresiji gena MMP1, 9 i 12 i koji mogu dovesti do neravnoteže proteinaze-antiproteinaze.

5.2.1. Genske varijante metaloproteinaza matriksa 1, 9 i 12

U promotorskom regionu gena za MMP1 analizirana je varijanta G-1607GG, koja pokazuje veću transkripcionu aktivnost gena, što može dovesti do povećane razgradnje kolagena (Rutter et al. 1998). Za analizu G-1607GG uspostavljeni su uslovi za detekciju metodom CSGE, što je omogućilo brzu detekciju ove varijante u samo dva koraka. Prednosti korišćenja ove metode su: jednostavnost, reproducibilnost, senzitivnost, odsustvo potrebe za posebnom pripremom PCR produkata i njen veliki kapacitet detekcije baznih zamena (Stankovic¹ et al. 2009).

U studiji koja je obuhvatila širu evropsku populaciju, alel -1607GG gena MMP1 je detektovan sa istom učestalošću od 48% i u kontrolnoj populaciji i u grupi obolelih od HOBP (Haq et al. 2010). Rezultati dobijeni u našoj studiji su u skladu sa ovim

rezultatima, pošto u našoj kontrolnoj grupi učestalost alela -1607GG iznosi 42,5%, dok u grupi obolelih ona iznosi 48,8%. Rezultati naše studije takode nisu pokazali ulogu genske varijante G-1607GG u modulaciji težine bolesti ili starosti kada se bolest javila. Za razliku od rezultata dobijenih u našem istraživanju, u studiji u kojoj je ispitivana uloga varijante G-1607GG u funkciji pluća ustanovljena je udruženost alela -1607G sa progresivnim padom FEV₁ vrednosti (Joos et al. 2002). Obzirom da ovaj alel karakteriše smanjena ekspresija MMP1, on bi pre mogao da ima protektivnu ulogu. Autori ove studije kao moguće objašnjenje navode pretpostavku da se alel -1607G nasleđuje zajedno sa drugim alelom odgovornim za pad funkcije pluća, pošto je gen za MMP1 smešten u klasteru sa drugim genima za MMP, na hromozomu 11q22-23.

U genu za MMP9 ispitivana je promotorska varijanta C-1562T koja dovodi do povećane promotorske aktivnosti. Učestalost ove varijante u evropskoj kontrolnoj populaciji iznosi 16% (Haq et al. 2010). Identična učestalost alela -1562T dobijena je u našoj studiji u kontrolnoj grupi, što potvrđuje valjanost naših rezultata, obzirom da su u skladu sa studijom koja je uključila 876 ispitanika sa 6 evropskih podneblja. Ispitivanje uloge varijante C-1562T u patogenezi HOBP dalo je kontraverzne rezultate. U dve studije sprovedene na japanskoj populaciji i u studiji na meksičkoj populaciji utvrđena je udruženost varijante -1562T sa emfizemom kod pušača i sa emfizemom koji dominira u gornjem delu pluća, kao i sa HOBP (Minematsu et al. 2001, Ito et al. 2005, Tesfaigzi et al. 2006). Međutim, u brojnim drugim studijama udruženost -1562T varijante sa HOBP nije potvrđena, što se može objasniti ulogom različitih genetičkih faktori kao uzroka bolesti u različitim populacijama, naročito kada su u pitanju složena oboljenja poput HOBP (Joos et al. 2002, Schirmer et al. 2009, Haq et al. 2010). U našoj studiji, u grupi obolelih, učestalost alela -1562T je bila nešto veća nego u kontrolnoj grupi (20,3% vs. 16,0%). Učestalost heterozigotnih nosilaca kod obolelih je iznosila 36,0%, dok u kontrolnim grupama, K 24,0% i PK 18,0%, pri čemu je poređenjem sa kontrolom PK ustanovljena značajna razlika (OR=2,57, p=0,03). Ovi rezultati ukazuju na moguću interakciju varijante C-1562T i duvanskog dima, odnosno potencijalnu ulogu genotipa C/T u patogenezi ove bolesti kod pušača. Imajući u vidu kontradiktorne rezultate o ulozi varijante C-1562T u HOBP, dobijene u različitim studijama, kao i važnost oba faktora, MMP9 i duvanskog dima, za patogenezu HOBP, ova kombinacija genetičkog i sredinskog faktora je odabrana za funkcionalnu analizu.

Funkcionalna promotorska varijanta A-82G u genu MMP12 (metaloelastaza makrofaga) je takođe analizirana u našoj studiji. Prisustvo varijante A-82G karakteriše blago smanjenje promotorske aktivnosti u odnosu na wt sekvencu. Učestalost alela -82G u kontrolnoj populaciji belaca iznosi 13% (Haq et al. 2010). U našoj studiji frekvencija alela -82G u kontrolnoj grupi K iznosi 15%, odnosno 17% u kontrolnoj grupi PK, a u grupi obolelih 11%. Prema rezultatima naše studije učestalost heterozigotnih nosilaca varijante A-82G snižena je u grupi pacijenata u odnosu na kontrolne grupe K i PK (17,4% vs. 24,0% odnosno 26,0%). Ovaj rezultat ukazuje na trend povećanja heterozigotnih nosioca alela -82G, u kontrolnoj grupi, što je dodatno izraženo u kontrolnoj grupi PK. To se može objasniti mogućom protektivnom ulogom varijante -82G koja je povezana sa smanjenom ekspresijom gena MMP12 a samim tim smanjenom elastolizom kod nosioca ovog genotipa. Ekspresija alela -82G iznosi oko 85% u odnosu na alel A, čime se može objasniti blaži uticaj ove varijante na nivo ekspresije MMP12 (Jormsjö et al. 2000). Trend koji je primećen u našoj studiji je u skladu sa rezultatima novije studije koja je uključila 8300 subjekata, u kojoj je pokazana pozitivna udruženost alela -82G sa FEV₁ vrednošću u grupi dece sa astmom i u grupi odraslih pušača, kao i sa smanjenim rizikom za pojavu HOBP kod pušača (Hunninghake et al. 2009). Nasuprot tome, u drugim studijama nije ustanovljena uloga A-82G u patogenezi HOBP ili padu plućne funkcije (Joos et al. 2002, Schirmer et al. 2009).

5.2.2. Genske varijante α_1 antitripsina Z i S

Promene u genu α_1 AT predstavljaju za sada jedini dokazani genetički faktor rizika za pojavu HOBP. Prosečna alelska učestalost najčešćih varijanti, alela S i Z, u opštoj populaciji iznosi 5% i 2% (Sandford et al. 1997). U našoj studiji detektovan je jedan heterozigotni nosilac alela S u grupi obolelih. U grupi pacijenata detektovana su 3 heterozigotna i 3 homozigotna, a u kontrolnoj grupi 3 heterozigotna nosioca alela Z. Međutim, razlika u genotipskim učestalostima između pacijenata i kontrolne grupe nije statistički značajna. Pored toga, distribucija alela Z nije u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži u podgrupi pacijenata obolelih od emfizema ($p < 0,05$; $\chi^2 = 21,82$, za $d=2$). Kod ovih pacijenata detektovani su jedan heterozigotni i 3 homozigotna nosioca Z alela. Učestalost alela Z, kod obolelih od emfizema, je iznosila 11,3%, pri čemu se za tu frekvenciju alela ne očekuje prisustvo 3 homozigota. Ovaj rezultat pored toga što potvrđuje ulogu varijante Z u razvoju

HOBP, predstavlja potvrdu dobro selektovane grupe pacijenata. Nosioi genotipa PI ZZ imaju tešku deficijenciju α_1 AT i karakteriše ih progresivan pad funkcije pluća čak i ako nisu pušači, dok se kod pušača emfizem javlja u ranom životnom dobu (Sandford et al. 1997).

5.3. Udruženost genske varijante G-308A gena TNF α sa patogeneom HOBP

TNF α je multifunkcionalni proinflamatorni citokin koji uglavnom proizvode makrofazi kao odgovor na oštećenje ili inflamaciju. Povišen nivo TNF α uočen je u BAL obolelih od HOBP. TNF α G-308A varijanta je povezana sa povećanjem bazične i indukovane ekspresije TNF α (Wilson et al. 1997), i od posebnog je interesa jer može dovesti do inicijacije ili održavanja inflamacije kod HOBP. Rezultati dobijeni u našoj studiji su ukazali na udruženost genotipa G/G sa HOBP. Genotip G/G je bio statistički značajno zastupljeniji u obolelih u odnosu na kontrolne grupe K i PK (82,6% vs. 69% i 66%, OR=2,13, p=0,04 i OR=2,44, p=0,036) (Stankovic² et al. 2009). Naši rezultati ukazuju da nosioi genotipa G/G imaju približno dva puta povećani rizik za pojavu HOBP. Uloga ove varijante u patogenezi HOBP je ispitivana u različitim populacijama, ali su dobijeni kontraverzni rezultati. Povezanost alela -308A i HOBP je ustanovljena u studijama izvedenim na Tajvanu i u Japanu (Huang et al. 1997, Sakao et al. 2001), dok druga studija sprovedena u Japanu, kao i studije u populaciji belaca nisu potvrdile ulogu ove varijante u razvoju HOBP ili težini ove bolesti (Ishii et al. 2000, Patuzzo et al. 2000, Higham et al. 2000, Seifart¹ et al. 2005, Ruse et al. 2007). Prema rezultatima dobijenim u našoj studiji, učestalost alela -308A u grupi obolelih je značajno snižena (9,3%) u odnosu na kontrolnu grupu K (17%) i PK (20%), (OR=0,50, p=0,033 i OR=0,41, p=0,016). Za razliku od pomenutih studija, naši rezultati ukazuju na protektivnu ulogu alela -308A u nastanku HOBP. Genotipske i alelske frekvence TNF α G-308A u našoj kontrolnoj grupi bile su slične sa kontrolnim grupama u engleskoj i nemačkoj populaciji, dok je kontrolna grupa u italijanskoj populaciji imala nižu frekvencu ove varijante (Higham et al. 2000, Seifart¹ et al. 2005, Ferrarotti et al. 2003). Zastupljenost alela -308A kod bolesnika u našoj studiji je bila niža u poređenju sa vrednostima dobijenim za pacijente u engleskoj i nemačkoj populaciji. S obzirom da etiologija HOBP obuhvata mnogostruke genetičke faktore kao i njihovu interakciju

sa faktorima spoljašnje sredine, moguće je da je odnos između genetičkih promena i nastanka HOBP etnički zavistan. Drugo moguće objašnjenje našeg rezultata je da se alel -308G zapravo nasleđuje vezano sa nekom drugom genskom varijantom odgovornom za patogenezu HOBP, obzirom da je gen za TNF α smešten u okviru visoko polimorfnog glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase III, na hromozomu 6p21.3.

5.4. Udruženost varijanti gena CFTR sa patogeneзом HOBP

Protein CFTR je kodiran visoko polimorfnim genom koji je do sada, pored cistične fibroze, povezan sa različitim kliničkim stanjima kao što su infertilitet kod muškaraca, hronični pankreatitis i diseminirane bronhiektazije (Dork et al. 1997, Ravnik-Glavac et al. 1996, Tzetis et al. 2001). Izmenjena funkcija CFTR dovodi do pojave viskoznog sekreta u plućima što vodi u hroničnu inflamaciju sa akutnim pogoršanjima usled oštećenog procesa mukocilijarnog klirensa. Najčešća mutacija u genu CFTR je F508del, prisutna u evropskoj populaciji sa učestalošću od 1,3%, dok je u našoj zdravoj populaciji detektovana sa nešto nižom učestalošću od 0,5% (Nikolic et al. 2006). Nosioци ove mutacije su šest puta učestaliji u grupi obolelih od HOBP u odnosu na kontrolnu grupu K (5,8 % vs. 1%), ali ova razlika nije statistički značajna (Stankovic et al. 2008). Prema do sada objavljenim podacima heterozigotni nosioци mutacije F508del imaju predispoziciju za pojavu diseminiranih bronhiektazija i astme, ali njena uloga u drugim plućnim bolestima i dalje nije dokazana (Sandford et al. 1997, Casals et al. 2004, Dahl et al. 2005).

U našoj studiji učestalost alela 5T je bila blago povišena u grupi obolelih u odnosu na kontrolnu grupu K (14,0% vs. 10,0%), što je u skladu sa rezultatima studije sprovedene u Danskoj kod obolelih od HOBP (Dahl et al. 2005).

Naši rezultati su takođe pokazali povišenu učestalost varijante R75Q kod obolelih u odnosu na kontrolnu grupu K (5,8% vs. 2%), ali ne i udruženost sa fenotipom HOBP. Distribucija varijante R75Q nije bila u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži u grupi obolelih ($p < 0,05$; $\chi^2 = 8,22$, za $d = 1$). Imajući u vidu frekvencu alela 75Q od 3,5%, prisustvo homozigotnih nosioца ove varijante nije očekivano, a u grupi obolelih detektovan je jedan homozigotni i četiri heterozigotna nosioца. Odsustvo

Hardy-Weinberg-ove ravnoteže se može javiti usled variranja u uzorku ili male veličine grupe, ali takode može da ukaže na važnost varijante 75Q u patologiji HOBP. U našoj prethodnoj studiji, koja je uključila 31-og pacijenta sa HOBP, učestalost genske varijante 75Q bila je značajno povišena kod obolelih u odnosu na zdravu kontrolnu grupu (8,06% vs. 0,97%, $p=0,002$) (Divac et al. 2004). Međutim, nakon povećanja grupe obolelih udruženost varijante 75Q i HOBP nije potvrđena. Moguće objašnjenje prvog rezultata je mala veličina grupe obolelih, što predstavlja statističku grešku tipa I. Nakon genotipizacije na većem uzorku učestalost nosioca alela 75Q je bila niža i nije potvrdila statističku značajnost, ali je zadržala odsustvo Hardy-Weinberg-ove ravnoteže, što sa druge strane potvrđuje ulogu varijante R75Q u HOBP. Takođe smo uočili kompletnu vezanost varijante 75Q sa alelom 470V, što je u skladu sa rezultatom dobijenim u studiji u kojoj je proučavana varijabilnost gena CFTR vezana za alele 470M i 470V u evropskoj populaciji (Pompei et al. 2006).

Učestalost alela 470V kod pacijenata i kontrolne grupe bila je veoma slična (57,6% vs. 58,0%), kao i distribucija genotipova, bez značajnih odstupanja. Poznato je da se maturacija i aktivnost hloridnog kanala razlikuju između alela 470M i 470V. Protein CFTR varijante 470M maturira sporije i ima 1,7 puta veću aktivnost hloridnog kanala u odnosu na varijantu 470V proteina (Cuppens et al. 1998). Prilikom analize modulatorne uloge, distribucija detektovanih varijanti gena CFTR bila je slična između podgrupa pacijenata za sve varijante osim za M470V. Statistički značajna razlika uočena je pri poređenju genotipa V/V koji je bio češće zastupljen u grupi pacijenata sa blagom/srednje teškom HOBP u odnosu na grupu sa teškom/veoma teškom HOBP (53,3%; vs. 26,8% OR=0,32, $p=0,016$). Oboleli od HOBP koji nose genotip V/V imaju 3,1 puta manji rizik za dobijanje teškog oblika bolesti. Nešto manja značajnost je uočena i kada je analizirano prisustvo makar jednog alela V (93,3% vs. 71,4%; OR=0,18, $p=0,029$), gde je mogućnost za razvoj teške HOBP smanjena 5,6 puta. U studiji izvedenoj na grčkoj populaciji ustanovljena je veza genotipa M/M i HOBP, što ukazuje na povezanost varijante M470V sa patogenezom ove bolesti (Tzetzis et al. 2001). Publikovani rezultati ukazuju na dominantno prisustvo varijante M u grupi pacijenata sa mutacijom u genu CFTR, što može ukazati na funkcionalnu manifestaciju alela M kada se nađe u kombinaciji sa drugom mutacijom (Lázaro et al. 1999, Casals et al. 2004). Ako se uzme u obzir preferencijalna udruženost "NonF508del" mutacija sa alelom 470M, postoji mogućnost da nosioci genotipa M/M mogu imati dodatne mutacije u genu CFTR, što bi moglo objasniti naše rezultate (Ciminelli et al. 2007).

5.5. Udruženost složenih genotipova sa patogenezom HOBP

HOBP je složeno oboljenje koje poput drugih kompleksnih bolesti karakteriše genetička heterogenost, fenokopija, nepotpuna penetrabilnost, interakcija genetičkih i sredinskih faktora kao i multilokusni efekat (Silverman et al. 2000). Dva glavna pristupa u izučavanju molekularne genetike kompleksnih bolesti obuhvataju analizu gena kandidata i poziciono kloniranje, ili genomsku analizu vezanosti u porodičnim studijama. Mogućnost identifikacije genetičkih faktora korišćenjem pozicionog kloniranja je umanjena usled poligene prirode bolesti, njene genetičke heterogenosti i interakcije sa sredinskim faktorima, što se prevashodno odnosi na uticaj duvanskog dima, kao i činjenicu da se bolest javlja u srednjem životnom dobu, pa većina članova porodice nije dostupna za analizu. Alternativni pristup predstavljaju asocijativne studije gena kandidata, u kojima se ispituju promene u genima od interesa u grupi obolelih i kontrolnoj grupi (Sandford et al. 1997). Ovakav pristup u analizi genetičkih faktora u nastanku HOBP korišćen je u ovoj studiji. Statistički značajna razlika u distribuciji alela ili genotipa može ukazati na direktnu udruženost datog alela sa bolešću. Međutim, udruženost određenog alela sa fenotipom, koja proističe iz statistički značajnog rezultata, može biti rezultat lažno pozitivne asocijacije, usled artefakta, npr. ukoliko analizirane grupe nisu adekvatno selektovane, ili alel može da se nasleđuje zajedno sa drugim alelom koji je direktno povezan sa bolešću.

Kod kompleksnih bolesti, poput HOBP, smatra se da je doprinos pojedinačnih alela patofiziologiji bolesti relativno ograničen, dok sinergističko dejstvo nekoliko štetnih alela može znatno uticati na razvoj bolesti (Silverman et al. 2000, Silverman 2006). Stoga smo u našoj studiji analizirali udruženost dva i tri pojedinačna genotipa, tj. složenih genotipova, sa nastankom HOBP. Složeni genotipovi su identifikovani poređenjem učestalosti između grupe pacijenata i kontrolnih grupa, K i PK. Analiza složenih genotipova uključila je prisustvo sledećih alela, na jednom ili oba hromozoma: CYP1A1 *2A, CYP2E1 *5B, GSTM1 -/-, GSTT1 -/-, GSTP1 105Ile/Val, mEPHX S, MMP1 -1607GG, MMP9 -1562T, MMP12 -82A, TNF α G-308A i CFTR 5T, CFTR M470V i CFTR F508del.

U sličnim studijama koje su do sada objavljene, uglavnom je ispitivana udruženost složenih genotipova iz pojedinačnih grupa gena, kao npr. samo u okviru grupe gena

uključene u odbranu od oksidativnog stresa ili remodelovanje ekstracelularnog matriksa ili inflamaciju ili imunski odgovor (Joos et al. 2002, Haq et al. 2010, Gaspar et al. 2004, He et al. 2002, Cheng et al. 2004). Naša studija je jedinstvena po tome što je bila usmerena na ispitivanje interakcija genskih varijanti svih grupa gena uključenih u patogenezu HOBP. Otkriveno je nekoliko kombinacija genotipova koji mogu predstavljati faktore rizika za nastanak HOBP.

Ustanovljeno je da su nosioci kombinacije za homozigotnu deleciju za GSTM1 i heterozigota za MMP9 promotorsku varijantu C-1562T (složeni genotip -/-:C/T), statistički značajno zastupljeniji u grupi obolelih u odnosu na kontrolnu grupu (24,4% vs. 11,0%). Nosioci ovog složenog genotipa imaju 2,61 puta povećan rizik za nastanak bolesti (OR=2,61, p=0.019). Poređenjem grupe obolelih sa kontrolnom grupom PK ta razlika je još izraženija (24,4% vs. 8,0%; OR=3,72, p=0.021). Naši rezultati su u skladu sa studijom Yanchina i saradnika koji su takođe pokazali udruženost složenog genotipa GSTM1:MMP9, -/-:C/T, sa patofiziologijom HOBP (Yanchina et al. 2004). GSTM1 je uključen u detoksifikaciju reaktivnih PAU epoksida koji nastaju kao produkti aktivnosti CYP enzima i prisutni su u duvanskom dimu. Kada je GSTM1 enzim odsutan (-/-), usled smanjene efikasnosti faze II ksenobiotičkog metabolizma, može doći do povećanog oksidativnog oštećenja i produkcije slobodnih radikala. Povećani oksidativni stresa u plućima dovodi do inflamatornog odgovora, inaktivacije antiproteinaza (α_1 AT) i indukcije apoptoze (Barnes et al. 2003). Sa druge strane, prisustvo alela -1562T u genu MMP9, kao i oksidativni stres, dovode do povećane ekspresije MMP9 (Zhang et al. 1999). MMP9 je uključena u razgradnju elastina, želatina i kolagena i uglavnom je produkuju makrofazi i neutrofili. Usled povećane ekspresije MMP9, kod nosioca genotipa C/T, i povećanog oksidativnog stresa usled odsustva enzima GSTM1, dolazi do intenzivne proteolitičke razgradnje komponenti međucelijskog matriksa i oštećenja plućnog parenhima. U našoj studiji ustanovljeno je da heterozigotni nosioci genotipa C/T imaju faktor rizika od 2,57 za razvoj HOBP. Nosioci složenog genotipa GSTM1:MMP9, -/-:C/T, imaju sličan faktor rizika (2,61) za pojavu bolesti. Međutim, poređenjem distribucija ovog složenog genotipa kod obolelih sa kontrolnom grupom PK, faktor rizika raste na 3,72. Ovaj rezultat ukazuje na povećanje faktora rizika za nastanak HOBP kod nosioca složenog genotipa GSTM1:MMP9, -/-:C/T, u interakciji sa duvanskim dimom, tj. kada se pacijenti porede sa rezistentnim pušačima. Rezultat naše studije je sličan sa rezultatom istraživanja u kome je pokazano da postoji interakcija genskih varijanti gena

uključenih u ksenobiotički metabolizam i obradu međućelijskog matriksa. U tom istraživanju ustanovljeno je da homozigotni nosioci alela CYP1A1 *2A i alela MMP9 -1562T imaju 3,3 puta veću šansu za nastanak bolesti (Cheng et al. 2009). Rezultati naše studije ukazuju na interakciju gena uključenih u ravnotežu oksidanti-antioksidanti i proteinaze-antiproteinaze sa duvanskim dimom, kroz tri nezavisna poređenja pojedinačnih i složenih genotipova, što obuhvata udruženost genotipa MMP9 C/T i složenog genotipa GSTM1:MMP9 (-/-:CT) sa HOBP. Pojedinačni genotipovi predstavljaju manji rizik za pojavu HOBP, dok koegzistencija dva genotipa uz interakciju sa duvanskim dimom predstavlja veći faktor rizika za ovu bolest.

U našoj studiji detektovano je više složenih genotipova koji predstavljaju značajne faktore rizika za nastanak HOBP, a koji uključuju genotip TNF α -308GG. TNF α G-308A varijanta je povezana sa povećanjem ekspresije TNF α i stoga bi se moglo očekivati da bude zastupljenija u bolestima koje karakteriše inflamacija, poput HOBP (Wilson et al. 1997). Međutim, naša ispitivanja su pokazala da genotip -308GG, inače povezan sa manjom ekspresijom TNF α , predstavlja faktor rizika za pojavu bolesti od približno 2,5 puta u poređenju sa obe kontrolne grupe. U dosadašnjim istraživanjima varijante G-308A dobijeni su kontradiktorni rezultati kako u HOBP, tako i u drugim bolestima uključujući i karcinom (Huang et al. 1997, Higham et al. 2000, Shih et al. 2006, Seifart² et al. 2005, Liu et al. 2005, Jeng et al. 2007). Složeni genotipovi, otkriveni u našoj studiji, koji su uključili genotip -308GG gena TNF α su: GSTM1:TNF α -/-:G/G, MMP9:TNF α C/T:G/G i MMP12:TNF α A/A:G/G.

Složeni genotip GSTM1:TNF α (-/-:G/G), predstavlja faktor rizika od 2,12 za pojavu bolesti, a njegova zastupljenost iznosi 48,8% kod obolelih i 31,0% u kontrolnoj grupi. On predstavlja interakciju grupa gena odgovornih za regulaciju oksidativnog stresa i inflamaciju, dva procesa koja su blisko povezana u HOBP. Oksidanti, endogenog ili egzogenog porekla, aktiviraju redoks senzitivne faktore AP1 i NF κ B koji otključavaju proinflamatorne gene, poput TNF α , koji dovode do nakupljanja neutrofila i makrofaga koji produkuju oksidanate. Pored toga oksidativni stres inaktivira HDA, koja sada ne može da zaključa proinflamatorne gene, što dovodi do dodatne amplifikacije inflamacije. Pomenuti složeni genotipovi uključuju genotip -308GG koji karakteriše smanjena ekspresija, pa njegova uloga u povećanju inflamacije na prvi pogled izgleda paradoksalno. Međutim, neka objašnjenja ipak postoje. Moguće je, kao što je već pomenuto, da se alel -308G nasleđuje vezano sa

drugim alelom koji zapravo predstavlja "patološki" alel, obzirom na blizinu gena TNF α i polimorfnog glavnog kompleksa histokompatibilnosti, kao i to da u samom promotoru TNF α postoje dodatne funkcionalne varijante koje mogu biti udružene sa pojavom bolesti. Vezano nasleđivanje alela zapravo predstavlja osnovno ograničenje asocijativnih studija gena kandidata. Stoga je poželjno izvršiti genotipizaciju okolnog regiona i analizu haplotipa. Multipla komparacija genotipova na relativno malom uzorku, takode može dovesti do nepouzdatih rezultata. Sa druge strane, ponavljanje određenog genotipa više puta u okviru značajnih kombinacija, kao što je slučaj sa genotipom -308GG, ukazuje na značaj datog genetičkog markera. Studija Kim-a i saradnika je pokazala udruženost prisustva olova u krvi sa visokim nivom TNF α u plazmi kod nosioca genotipa GSTM1 -/- ili TNF α -308GG. Rezultati ove studije i rezultati dobijeni u našoj studiji ukazuju da ova dva genotipa predstavljaju genetičke faktore rizika udružene sa inflamatornim odgovorom (Kim et al. 2007). U drugoj studiji je ustanovljeno da genotip -308GG dovodi do značajnog pada FEV₁ vrednosti u poređenju sa nosiocima genotipova GA i AA nakon izlaganja dejstvu ozona (Yang et al. 2008).

Naša studija je po prvi put pokazala udruženost genaskih varijanti GSTM1 i TNF α gena koji su uključeni u odbranu od oksidativnog stresa i inflamaciju i hronične opstruktivne bolesti pluća.

Složeni genotip MMP9:TNF α (C/T:G/G) je statistički češće zastupljen u grupi obolelih u odnosu na kontrolnu grupu (32,6% vs. 15,0% OR=2,74, p=0,005). Razlika je još značajnija kada se grupa pacijenata poredi sa kontrolnom grupom PK (32,6% vs. 8,0% OR=5,55, p=0,001), pri čemu faktor rizika sa 2,74 raste na 5,55, što ukazuje na interakciju ovog složenog genotipa sa duvanskim dimom. Obzirom da TNF α indukuje ekspresiju MMP9, postoji jasna fiziološka veza između ova dva molekula (Atkinson et al. 2003). Složeni genotip C/T:G/G uključuje prisustvo alela T gena MMP9 koji dovodi do povećanja promotorske aktivnosti MMP9. Povećana ekspresija MMP9 ima veoma važnu ulogu u patofiziologiji HOBP (Barnes et al. 2003). Indukcijom MMP9 sa TNF α održava se odnos aktivnosti promotora, karakterističan za gensku varijantu C-1562T (Slika 32). Složeni genotip MMP9:TNF α , kao i prethodno pomenuti genotip GSTM1:TNF α , pokazuju udruženost alela odgovornih za povećanu ekspresiju proteinaza (MMP9 -1562T) i smanjenu odbranu od oksidativnog stresa (GSTM1 -/-) sa varijantom -308G gena TNF α povezanom sa smanjenom promotorskom aktivnošću TNF α . Međutim, prema objavljenim podacima, upravo je genotip G/G povezan sa povišenim nivom TNF α u

plazmi, pa se može pretpostaviti da se nasleđuje zajedno sa drugim štetnim alelom koji još uvek nije identifikovan (Kim et al. 2007). Složeni genotip MMP9:TNF α pokazuje jaku interakciju sa duvanskim dimom, što predstavlja još jednu potvrdu udruženosti multiplih faktora rizika u pojavi HOBP. Ovaj složeni genotip povezuje gene uključene u procese ravnoteže proteinaze-antiproteinaze i inflamaciju u HOBP.

Složeni genotip MMP12:TNF α (A/A:G/G) je značajno češće prisutan u grupi obolelih u odnosu na kontrolnu grupu PK (65,1% vs. 42% OR=2,58, p=0,012). Zajedničko za MMP12:TNF α i MMP9:TNF α kombinacije genotipova je da je prisustvo alela A, gena MMP12, povezano sa većom aktivnošću promotora MMP12, kao i u slučaju varijante MMP9 promotora (Jormsjö et al. 2000). Uloga MMP12 u indukciji oštećenja pluća pokazana je na knock-out MMP12 miševim kod kojih po izlaganju duvanskom dimu ne dolazi do pojave emfizema (Hautamaki et al. 1997). Takođe je poznato da TNF α reguliše ekspresiju MMP12, kao i da duvanski dim indukuje ekspresiju MMP12 putem indukciju TNF α (Lavigne et al. 2004, Lavigne et al. 2005).

Udruženost "patoloških" genskih varijanti MMP12 i TNF α , uz dejstvo duvanskog dima, objašnjava se fiziološkom povezanošću MMP12 i TNF α i ukazuje na važnost interakcije analiziranih alela u patogenezi HOBP.

Naša studija je po prvi put pokazala udruženost genskih varijanti MMP9 i MMP12 gena koji su uključeni u remodelovanje međucelijskog matriksa sa varijantom gena TNF α uključenog u inflamaciju, i hronične opstruktivne bolesti pluća.

Identifikovali smo i tri složena genotipa koja uključuju udruženost CFTR F508del mutacije, u heterozigotnom obliku, sa genotipovima GSTM1 -/-, MMP9 -1562CT i TNF α -308GG, koji predstavljaju značajne faktore rizika za nastanak HOBP. Mutacija F508del predstavlja deleciju tri bazna para koji kodiraju fenilalanin na mestu 508 u proteinu CFTR, i prisutna je na oko 70% hromozoma koji nose mutirani CFTR gen. Ova delecija dovodi do izmene u obradi proteina, tako da se mutirani protein ne transportuje do apikalne membrane već ostaje u endoplazmatičnom retikulumu. Smatra se da heterozigotni nosioci mutiranog gena CFTR imaju 50% funkcije normalnog proteina CFTR i da je to dovoljno da ne dođe do pojave bolesti. Ukoliko bi došlo do dalje redukcije funkcije proteina usled prisustva neke blage mutacije ili polimorfizma može doći do razvoja neke od monosimptomatskih kliničkih slika. U našoj studiji ova mutacija detektovana je sa

učestalosti od 5,8% kod obolelih i 1% u kontrolnoj grupi K. Mutacije u genu CFTR ne uzrokuju samo klasičnu cističnu fibrozu sa manjom ili većom varijabilnošću kliničke slike. Opisani su atipični slučajevi cistične fibroze sa kliničkom slikom koja se znatno razlikuje od klasičnog oblika bolesti (Zielenski 2000, Noone et al. 2001). Osim toga, različiti tipovi i težine mutacija u genu CFTR leže u osnovi širokog opsega različitih fenotipova koji se kreću od klasičnog oblika cistične fibroze na jednom kraju, do monosimptomatskih oblika bolesti na drugom (Zielenski 2000, Dork et al. 1997). Novija istraživanja su pokazala da mutacije u genu CFTR takođe mogu biti povezane sa nekim plućnim oboljenjima kao što su idiopatske diseminirane bronhiektazije, sarkoidoza, plućni emfizem, hronični bronhitis, alergijska bronhopulmonarna aspergiloza i astma (Bombieri et al. 1998, Tzetis et al. 2001).

Složeni genotip GSTM1:CFTR (-/-:wt/F508del) detektovan je sa učestalosti od 4,7% u grupi obolelih, dok nijedan nosilac nije identifikovan u kontrolnoj grupi, a razlika u distribuciji je statistički značajna ($p=0,044$). Ovaj složeni genotip povezuje gene uključene u odbranu od oksidativnog stresa i mukocilijarni klirens. CFTR funkcioniše kao jonski kanal i propušta jone Cl^- , ali i organske molekule kao što je redukovani glutation (GSH) i na taj način je uključen u kontrolu oksidativnog stresa (Linsdell et al. 1998). Kada je prisutna mutacija F508del, usled smanjene količine proteina u membrani dolazi do smanjenog efluksa GSH, što inače karakteriše obolele od cistične fibroze (Roum et al. 1993). Tripeptid GSH vrši direktnu neutralizaciju slobodnih radikala i predstavlja najvažniji antioksidant u ASL, ali deluje i kao kosupstrat u enzimskim reakcijama, u kojima učestvuju enzimi GST, koji vrše konjugaciju elektrofila i GSH. Smanjeni efluks GSH dovodi do povećanog oksidativnog stresa, koji je dodatno povećan usled nedostatka enzima GSTM1. Dolazi do smanjenja odnosa redukovani/oksidovani glutation, GSH/GSSG, i aktiviranja AP1 i NF κ B transkripcionih faktora što dovodi do amplifikacije oksidativnog stresa i inflamacije. Sa druge strane pokazano je da oksidativni stres dovodi do smanjene ekspresije proteina CFTR, tako što smanjuje stabilnost informacione RNK, što u slučaju prisustva mutacije F508del, uzrokuje dodatno smanjenje aktivnosti hloridnog kanala (Cantin et al. 2006). Redukovana aktivnost proteina CFTR dovodi do promena u sastavu fluida i sekreta, povećanju viskoznosti i progresije opstrukcije i fibroze pluća (Rowe et al. 2005).

Složeni genotip MMP9:CFTR (C/T:wt/F508del) detektovan je sa učestalosti od 4,7% u grupi obolelih, dok u kontrolnoj grupi nije identifikovan nijedan nosilac, a

razlika u distribuciji je bila statistički značajna ($p=0,044$). Ovaj složeni genotip povezuje gene uključene u remodelovanje međucelijskog matriksa i mukocilijarni klirens. MMP imaju krucijalnu ulogu u cističnoj fibrozi jer učestvuju u regulaciji funkcije CFTR kanala, inflamaciji i remodelovanju u plućima (Jouneau et al. 2008). Pokazano je da je nivo MMP9 u BAL pacijenata obolelih od cistične fibroze značajno povećan i da pozitivno koreliše sa procentom neutrofila (Ratjen et al. 2002). Prisustvo alela -1562T gena MMP9, dovodi do povećane ekspresije MMP9, usled čega dolazi do intenziviranja proteinazne aktivnosti u plućima, destrukcije tkiva, fibroze i inflamacije. Usled prisustva varijante F508del gena CFTR, u uslovima povećane proteolize i oksidativnog stresa dolazi do dodatnog smanjenja aktivnosti CFTR kanala, oštećenja mukocilijarnog klirensa i iniciranja začaranog kruga patofizioloških procesa koji opisuju HOBP.

Složeni genotip TNF α :CFTR (G/G:wt/F508del) je takođe pokazao udruženost sa HOBP, obzirom da je detektovan sa učestalošću od 5,8% kod obolelih, dok u kontrolnoj grupi nije bio detektovan ni jedan nosilac ($p=0,02$). Kao što je već istaknuto za prethodno pomenute složene genotipove koji uključuju TNF α G/G genotip, tako i za ovaj, uz pretpostavku da je indirektno povezan sa povećanom inflamacijom koja prati HOBP uz dodatak CFTR F508del varijante ukazuje na podložnost nastanku HOBP.

Naša studija je po prvi put pokazala udruženost genskih varijanti GSTM1, MMP9 i TNF α sa CFTR F508del mutacijom, ali zbog njihove relativno retke zastupljenosti, ulogu ovih složenih genotipova bi trebalo proveriti na većem uzorku.

U ovom istraživanju pratili smo prisustvo udruženosti tri gena kao mogućeg faktora rizika za nastanak HOBP. Neke od identifikovanih složenih kombinacija su već uočene prilikom analize interakcija dva gena i predstavljaju potvrdu tih interakcija. Udruženost gena CYP1A1:GSTM1:mEPHX (genotip *1A/*2A:-/-:S/(S)), zastupljena je sa 7% u grupi obolelih i sa 1% u kontrolnoj grupi, što je na granici statističke značajnosti. Prema našim rezultatima nosioci ovog složenog genotipa imaju 7,42 puta veću šansu za pojavu bolesti (OR=7,42, $p=0,050$). Na ravnotežu oksidanti-antioksidanti utiče prisustvo ksenobiotika, poreklom ne samo iz duvanskog dima već i iz zagađenog vazduha. Genske varijante gena uključenih u fazu I i II ksenobiotičkog metabolizma mogu da menjaju enzimsku aktivnost i kinetiku reakcija aktivacije i detoksifikacije različitih toksičnih jedinjenja i time uzrokuju povećani oksidativni stres (Castell et al. 2005). Upravo ova kombinacija varijanti u

genima faze I i II opisuje neravnotežu reakcija aktivacije i detoksifikacije ksenobiotika, i omogućava ostvarivanje njihovog toksičnog dejstva. Prisustvo alela CYP1A1 *2A povezano je sa povećanom aktivnošću enzima CYP1A1 i samim time povećanom koncentracijom reaktivnih PAU intermedijera, u čijoj aktivaciji ovaj enzim učestvuje. Sa druge strane nedostatak GSTM1 usled prisustva homozigotne delecije (-/-) kao i usporena aktivnost enzima mEPHX, usled prisustva alela S na jednom ili oba hromozoma, smanjuju efikasnost faze II, detoksifikacije i mogu dovesti do povišenog oksidativnog stresa. Oksidativni stres uzrokuje oksidativnu inaktivaciju antiproteinaza, nakupljanje neutrofila u plućima kao i indukciju ekspresije proinflamatornih gena, što predstavlja karakteristike HOBP.

Naša istraživanja su po prvi put pokazala udruženost složenog genotipa koji uključuje interakciju hiperaktivnosti enzima faze I (CYP1A1 *2A) i deficijencije ili snižene aktivnosti enzima faze II (GSTM1 -/- i mEPHX S) sa HOBP (Stankovic et al. 2006). Udruženost kompleksnih genotipova koji uključuju varijante gena odgovorne za odbranu od oksidativnog stresa, primećena je i u drugim studijama, ali za razliku od naše, u njima su sa HOBP povezane samo varijante faze II. U studiji HOBP sprovedenoj na Tajvanu ustanovljeno je da kombinacija gena GSTM1:GSTP1:mEPHX (složeni genotip -/-:Ile/Ile:S/(S)), predstavlja faktor rizika od 6,8 za nastanak HOBP uzrokovan dejstvom duvanskog dima (Cheng et al. 2004). U drugoj studiji ustanovljena je udruženost GSTM1:GSTT1:GSTP1 (složeni genotip -/-:-/-:Ile/Ile) sa faktorom rizika od 2,83 za nastanak HOBP i sa progresivnim padom plućne funkcije kod pušača (He et al. 2002). Ovi rezultati zajedno sa rezultatom dobijenim u našoj studiji potvrđuju ulogu multiplih genetičkih faktora u patogenezi HOBP, ali takođe ukazuju na važnost različitih genetičkih faktora u različitim populacijama koji mogu dovesti do istog patološkog stanja.

Prethodno opisana udruženost složenog genotipa koji uključuje MMP9:TNF α (genotip C/T:G/G) sa HOBP, javlja se u nekoliko kombinacija sa genima uključenim u ksenobiotički metabolizam. Jedna od njih uključuje složeni genotip CYP1A1:MMP9:TNF α (*1A/*2A:T/(T):G/G), i predstavlja pet puta veći faktor rizika za pojavu bolesti kod nosioca ove kombinacije, kada se grupa obolelih poredi sa kontrolnom grupom (9,3% vs. 2,0% OR=5,03, p=0,046). Učestalost nosioca kombinacije gena GSTM1:MMP9:TNF α (složeni genotip -/-:T/(T):G/G), je značajno veća kada se grupa obolelih poredi sa kontrolnom grupom K (23,3% vs. 7,0% OR=4,03; p=0,003). Faktor rizika za nosioce ove kombinacije se znatno povećava (sa 4,03 na 14,85) kad se grupa obolelih poredi sa kontrolnom grupom PK (23,3%

vs. 2,0% OR=14,85; $p=0,0005$), što ukazuje na snažnu interakciju ovog kompleksnog genotipa sa duvanskim dimom. Kombinacija GSTT1:MMP9:TNF α sa genotipovima -/-:T/(T):G/G, pokazala je udruženost sa bolešću uz interakciju sa duvanskim dimom. Njena učestalost kod grupe obolelih iznosi 8,1%, dok kod kontrole PK nije detektovano prisustvo ovog složenog genotipa (OR=9,53; $p=0,047$). Kombinacija gena MMP12 i TNF α sa genotipovima A/A i G/G, uz dodatak GSTM1 -/- genotipa je značajno češće zastupljena kod obolelih u odnosu na kontrolnu grupu (38,4% vs. 24% OR=1,97; $p=0,04$). Navedene kombinacije od tri gena sadrže već opisane asocijacije dva gena, koje obuhvataju MMP9 ili MMP12 i TNF α , čime se zapravo potvrđuje važnost i uloga ovih složenih genotipova u HOBP, kojima su sada pridodati genotipovi CYP1A1 *1A/*2A, GSTM1 -/- ili GSTT1 -/-. Pošto pomenuti genotipovi gena odgovornih za odbranu od oksidativnog stresa mogu dovesti do povećanog oksidativnog stresa, koji sa jedne strane indukuje ekspresiju MMP, a sa druge strane povećava ekspresiju TNF α , jasno je da ovi složeni genotipovi pored povećanja neravnoteže oksidanti-antioksidanti, doprinose i neravnoteži proteinaze-antiproteinaze i inflamaciji, odnosno karakteristikama koje prate tok HOBP (Barnes et al. 2003).

Složeni genotip GSTM1 i TNF α (-/-:G/G) uz dodavanje alela GSTP1 105Val na barem jednom hromozomu predstavlja značajni faktor rizika (30,2% vs. 15% OR=2,46; $p=0,014$) za nastanak HOBP. Mada je u dosadašnjim studijama uglavnom alel GSTP1 105Ile, usled slabije katalitičke efikasnosti, bio udružen sa patofiziologijom HOBP, ustanovljeno je da i alel 105Val ima manju konjugacionu aktivnost prema određenim supstratima (Watson et al. 1998). Obzirom na već opisanu kombinaciju dva gena GSTM1:TNF α (složeni genotip -/-:G/G), prisustvo alela GSTP1 105Val samo pojačava efekat oksidativnog stresa i potvrđuje važnost ove kombinacije u patologiji HOBP.

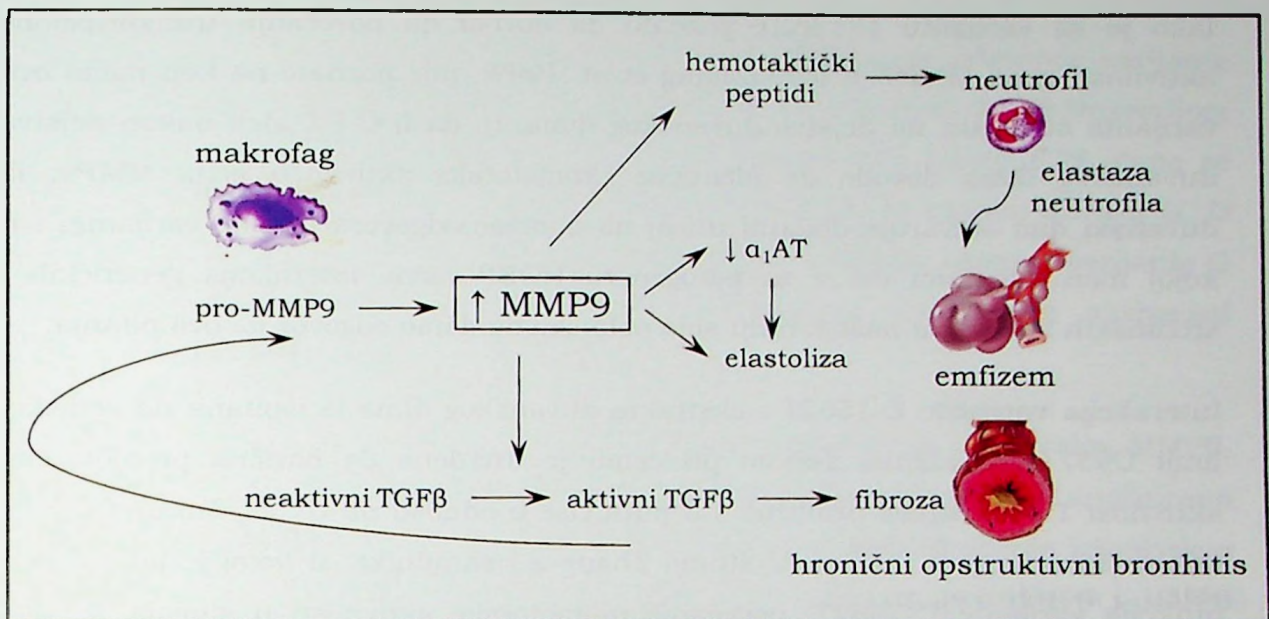
U ovoj studiji identifikovano je nekoliko pojedinačnih genskih varijanti, i veći broj složenih genotipova koji uključuju dva ili tri gena u asocijaciji sa HOBP. Ovi rezultati su u skladu sa zapažanjem da je kod poligenskih oboljenja, poput HOBP, neophodna aktivnost većeg broja gena, i da sklonost ka ovoj bolesti zavisi od istovremene aktivnosti više genskih varijanti (He et al. 2002, Gaspar et al. 2004, Cheng et al. 2004, Cheng et al. 2009). Pojedinačne genske varijante imaju mali učinak u nastanku bolesti i jasno je da je za patogenezu HOBP važna koegzistencija nekoliko krucijalnih varijanti. Da bismo dobili kompletniju sliku o ulozi identifikovanih gen-gen interakcija neophodna su dalja ispitivanja na nivou iRNK i

proteina. Međutim, sama priroda analiziranih, genskih varijanti je različita. U izvesnim slučajevima promena se odražava na sekvencu proteina i utiče na njegovu aktivnost (mEPHX), ili je prisutna u promotoru gen i menja njegovu ekspresiju (MMP), ili pak dovodi do potpunog izostanka genskog produkta (GSTM1), što znatno otežava mogućnost ispitivanja njihovih interakcija u jednom sistemu. Sa druge strane, ostaje mogućnost ispitivanja na primarnim ćelijskim linijama sa tačno definisanim genotipskim kombinacijama, ali u tom slučaju se ne može isključiti uticaj drugih nedetektovanih genskih promena, obzirom da se ne može analizirati dovoljno veliki broj uzoraka.

Ne samo zbog svoje složene genetske osnove, već i zbog teškoća u analizi usled multiplih kombinacija koje mogu dovesti do ovog stanja, HOBP i dalje predstavlja misteriju u pogledu molekularnih mehanizama koji uzrokuju ovo stanje i samim tim veliki izazov u istraživanju.

5.6. Odgovor MMP9 varijante C-1562T na dejstvo ekstrakta duvanskog dima

Iako je poznato da MMP9 ima izraženu ulogu u patologiji HOBP, kao i da je njen nivo povišen u BAL i plućnom parenhimu obolelih od emfizema (Barnes et al. 2003), precizan mehanizam dejstva MMP9 u patogenezi HOBP nije poznat. Obzirom na veliki broj supstrata sa kojima MMP9 interaguje i širok spektar ćelija koje je eksprimiraju, raspoloživi podaci ukazuju na njenu istovremenu uključenost u brojne događaje u organizmu (Atkinson et al. 2003). MMP9 učestvuje u degradaciji komponenti međućelijskog matriksa, pri čemu nastaju peptidi koji imaju hemotaktička svojstva prema neutrofilima i makrofazima, što dovodi do njihovog nakupljanja u parenhimu pluća i disajnim putevima. Takođe, MMP9 inaktivira α_1 AT i aktivira TGF β 1, što dovodi do elastolize i fibroze malih disajnih puteva koji karakterišu patogenezu ove bolesti (slika 39).



Slika 39. Uloga MMP9 u patogenezi HOBP. Preuzeto i preuređeno prema Barnes et al. Eur Respir J. 2003;22(4):672-88.

MMP-eng. Matrix Metalloproteinase; TGFβ-eng. Transforming Growth Factor β; α₁AT-α₁ antitripsin.

Glavni izvor MMP9 u plućima čine makrofazi. Alveolarni makrofazi pušača obolelih od HOBP oslobađaju veću količinu MMP9 u odnosu na zdrave pušače i nepušače, a makrofazi zdravih pušača oslobađaju veću količinu MMP9 u poređenju sa nepušačima (Russell et al. 2002). Indukcija ekspresije gena MMP9 nakon stimulacije duvanskim dimom odvija se putem aktivacije NFκB (Shishodia et al. 2004). Makrofazi obolelih od HOBP, slično stimulaciji duvanskim dimom, oslobađaju veće količine MMP9 u odgovoru na stimulaciju IL1β i lipopolisaharidima u odnosu na zdrave pušače i nepušače (Russell et al. 2002). Povećana produkcija MMP9 kod obolelih od HOBP u poređenju sa zdravim pušačima ukazuje na postojanje drugih, do sada neidentifikovanih faktora, koji osim dejstva duvanskog dima, mogu dovesti do povećane ekspresiju MMP9 (Lim et al. 2000, Barnes et al. 2003). Jedan od potencijalnih faktora je i promena u okviru gena MMP9. Analizom varijante C-1562T u genu za MMP9, u našoj studiji je ustanovljeno da heterozigotni genotip predstavlja faktor rizika od 2,57 za razvoj HOBP, kada se grupa obolelih poredi sa rezistentnim pušačima. Prisustvo alela -1562T u interakciji sa duvanskim dimom može dovesti do dodatnog povećanja produkcije MMP9 kod obolelih u odnosu na zdrave pušače i samim tim predstavlja važan genetički faktor koji u sadejstvu sa duvanskim dimom može dovesti do amplifikovanja scenarija prikazanog na Slici 39 i razvoja bolesti.

Iako je za varijantu C-1562T poznato da dovodi do povećanja transkripcione aktivnosti gena MMP9 *in vitro* (Zhang et al. 1999), nije poznato na koji način ova varijanta odgovara na dejstvo duvanskog dima, tj. da li C i T aleli nakon dejstva duvanskog dima dovode do identične promotorske aktivnosti gena MMP9, ili duvanski dim ostvaruje dodatni uticaj na obrazac odgovora genske varijante, i u kojoj meri. Obzirom da je za patogenezu HOBP važna interakcija genetičkih i sredinskih faktora, u našem radu smo pokušali da damo odgovor na ova pitanja.

Interakcija varijante C-1562T i ekstrakta duvanskog dima je ispitana na ćelijskoj liniji U937 luciferaznim esejom pri čemu je utvrđeno da bazična promotorska aktivnost T alela iznosi približno 1,3 puta više u odnosu na C alel, što predstavlja statistički značajnu razliku. U studiji Zhang-a i saradnika, u kojoj je analizirana funkcija varijante C-1562T, povećanje promotorske aktivnosti u slučaju T alela iznosilo je približno 1,5 puta u odnosu na C alel. Jedan od razloga za ovo malo odstupanje može biti korišćenje različitih model sistema. Zhang i saradnici su u radu koristili ćelijsku liniju MALU, tj. mišije makrofage, dok su naši rezultati dobijeni na humanoj, monocitnoj liniji U937.

Ono što do sada nije bilo poznato, a ispitano je u našoj studiji, je odgovor genske varijante C-1562T na stimulaciju duvanskim dimom. Razlika u odgovoru wt sekvence i varijante promotora MMP9 iznosila je 205,3% i 296,6% nakon stimulacije duvanskim dimom. Oba konstrukta, pGL-pMMP9C i pGL-pMMP9T, su pokazala statistički značajno ($p < 0,01$) povećanje promotorske aktivnosti nakon stimulacije duvanskim dimom, ali ne u istoj meri. U slučaju wt sekvence stimulacija ekstraktom duvanskog dima povećava promotorsku aktivnost MMP9 dva puta, dok to povećanje iznosi tri puta kada je prisutna genska varijanta u poređenju sa bazičnom aktivnošću wt alela. Promotorska aktivnost konstrukta sa alelom C, nakon stimulacije, raste približno dva puta, a alela T približno 2,4 puta u odnosu na bazične vrednosti dobijene za odgovarajuće alele. Rezultati naše studije su pokazali da odgovor alela T na stimulaciju ekstraktom duvanskog dima dovodi do dodatnog povećanja promotorske aktivnosti gena MMP9 u odnosu na povećanje do koga dovodi stimulacija alela C. Upravo se kumulativnim povećanjem promotorske aktivnosti usled prisustva T alela i dejstva duvanskog dima može objasniti povećana ekspresija MMP9 u makrofazima obolelih od HOBP u poređenju sa zdravim pušačima i nepušačima.

Sličan rezultat, kao u našoj studiji, dobijen je ispitivanjem odgovora varijante G-1607GG gena MMP1 na dejstvo duvanskog dima (Mercer et al. 2009). Insercijom jednog guanina, formira se vezivno mesto za transkripcioni faktor ETS, čime se objašnjava dva puta veća promotorska aktivnost alela GG u odnosu na alel G. U ovom radu ustanovljeno je da stimulacijom duvanskim dimom odgovor varijante G raste dva puta, a varijante GG 3,5 puta u odnosu na bazične aktivnosti odgovarajućih konstrukata.

Osim pušačkog statusa, efekat C-1562T genske varijante na ekspresiju MMP9, zavisi i od fizioloških uslova i tkiva koje se analizira. U studiji u kojoj je analizirana uloga varijante C-1562T na aktivnost enzima MMP9 u plazmi metodom želatinskog zimograma, nije ustanovljeno postojanje razlike u aktivnosti pro-MMP9 i MMP9 poređenjem genotipa C/C sa genotipovima C/T i T/T (Demacq et al. 2006). Za razliku od pomenute studije, u istraživanju u kome je analizirana ekspresija informacione RNK u alveolarnim makrofazima obolelih od emfizema, ustanovljeno je da pacijenti sa alelom -1562T imaju značajno veću ekspresiju MMP9 u odnosu na nosioce alela C (Abboud et al. 2006). U studiji Demacq-a i saradnika analizirani su uzorci plazme nepušača, dok su u studiji Abboud-a i saradnika korišćeni uzorci plućnog tkiva obolelih od emfizema.

Naši rezultati potvrđuju interakciju genetičkih faktora i duvanskog dima u patogenezi HOBP, kao i važnost interakcije pojedinačnih faktora rizika koji mogu biti odgovorni za razvoj HOBP. Upravo se povećanjem promotorske aktivnosti usled prisustva alela T i dejstva duvanskog dima može objasniti povećana ekspresija MMP9 u makrofazima obolelih od HOBP u poređenju sa zdravim pušačima.

Obzirom da je alel T doveo do potenciranja odgovora na stimulaciju ekstraktom duvanskog dima, prepostavili smo da je sekvenca u okviru polimorfnog mesta odgovorna za dodatno povećanje odgovora. Prisustvo dodatnih promena u konstruktima isključeno je kompletnim sekvenciranjem oba konstrukta. Zhang i saradnici su na osnovu eksperimenata usporene elektroforetske pokretljivosti ustanovili da promena C→T dovodi do ukidanja mesta za vezivanje nepoznatog transkripcionog represora, što je razlog povećane transkripcione aktivnosti u prisustvu alela T. Priroda ovog represora do sada nije otkrivena. Na osnovu rezultata Zhang-a i saradnika, moglo bi se prepostaviti da se "represor" sa manjim afinitetom vezuje za T nego za C alel. U tom slučaju možemo dalje prepostaviti da je neka od komponenti duvanskog dima, zajedno sa izmenjenom sekvencom (T

umesto C) odgovorna za dodatno povećanje promotorske aktivnosti. Uz pretpostavku da duvanski dim dodatno smanjuje afinitet vezivanja "represora" za alel T, moglo bi se objasniti dodatno povećanje aktivnosti promotora u prisustvu alela T. Naravno, ovu pretpostavku treba detaljno ispitati, kao i identifikovati nepoznati transkripcioni represor.

Obzirom da do sada nije identifikovana priroda proteinskog faktora odgovornog za razliku u ekspresiji varijante C-1562T gena MMP9, *in silico* analizom, programskim paketom MatInspector v2.0, ispitani smo postojanje potencijalnih mesta za vezivanje transkripcionih faktora u okviru polimorfne sekvence. Uočena je razlika u vezivanju tri transkripciona faktora za koja postoje potencijalna mesta za vezivanje u regionu 13 nukleotida uzvodno i nizvodno od C-1562T sekvence. Promena C-1562T ukida potencijalna mesta za vezivanje sva tri faktora. Identifikovani su sledeći transkripcioni faktori:

1. ZF5 protein sadrži dva funkcionalna domena, Kruppel-ov tip cinkanih prstića na C-terminusu i POZ (eng. Poxvirus and Zinc Finger) domen na N-terminusu (Numoto et al. 1999). On se za -1562C sekvencu vezuje sa verovatnoćom od 96,3%. ZF5 funkcioniše kao transkripcioni represor HSV1 TK, mišjeg *c-myc* i β aktinskog promotora, ali i kao aktivator promotora HIV1 LTR (eng. Human Immunodeficiency Virus, Long Terminal Repeat) (Kaplan et al. 1997). Humani homolog, mišjeg ZF5 proteina, je označen kao hZF5.
2. HES (eng. Homologues of Enhancer of Split) familiju proteina čine sisarski homolozi proteina *D. melanogaster* kodirani genskim kompleksom Enhancer of Split. Oni funkcionišu kao generalni korepresori transkripcije tako što regrutuju TLE (eng. Transducin Like Enhancer Of Split) proteine (Palaparti et al. 1997). Oni se za -1562C sekvencu vezuju sa verovatnoćom od 92,5%.
3. AHR-ARNT je heterodimer koji se aktivira vezivanjem inducera PAU za AHR u citoplazmi, nakon čega se receptor AHR translocira u nukleus gde dimerizuje sa translokatorom ARNT. Heterodimer se zatim vezuje za odgovarajuću sekvencu u promotoru i dovodi do indukcije ekspresije ciljnog gena. Ovim mehanizmom je regulisana ekspresija gena uključenih u metabolizam ksenobiotika kao što su CYP1A1 i GST (Watanabe et al. 2001). AHR-ARNT se za -1562C sekvencu vezuje sa verovatnoćom od 96,0%. AHR može biti aktiviran duvanskim dimom. Međutim, ustanovljeno je da ekstrakt duvanskog dima dovodi do represije AHR, tj. njegove

proteolitičke degradacije nakon aktivacije ligandom (Martey et al. 2005). Na ovaj način teško bi se objasnio manji odgovor -1562C alela na dejstvo duvanskog dima u odnosu na T alel, imajući u vidu da prisustvo varijante ukida mesto vezivanja represora i da se kompleks AHR-ARNT potencijalno ne vezuje za alel sa -1562T sekvencom.

Transkripcioni faktori hZF5 i HES su potencijalni kandidati za dalju funkcionalnu analizu u cilju identifikacije faktora odgovornog za promenu u ekspresiji MMP9 u zavisnosti od prisustva C-1562T varijante. Obzirom da njihova interakcija sa duvanskim dimom do sada nije opisana, neophodna je i analiza njihove funkcije u interakciji sa duvanskim dimom. Na taj način bi se rasvetlio molekularni mehanizam odgovora varijante C-1562T na dejstvo duvanskog dima.

5.7. Ekspresija gena i aktivnost enzima MMP9 pod dejstvom ekstrakta duvanskog dima

Povećana ekspresija MMP9 u plućima obolelih od HOBP i pušača se često ističe kao jedan od važnih faktora odgovornih za degradaciju plućnog parenhima koja dovodi do inflamacije i oštećenja alveola. Mnogi medijatori inflamacije, poput TNF α , endotoksina, IL1, IL8 i oksidativnog stresa, indukuju ekspresiju MMP9 u monocitima i makrofazima, najverovatnije putem aktivacije transkripcionog faktora NF κ B (Moon et al. 2004, Ma et al. 2004). Makrofazi izolovani iz BAL pušača oslobađaju dva puta veću količinu MMP9 u odnosu na makrofage nepušača (Lim et al. 2000). U dosadašnjim studijama je pokazano da tretman ćelija ekstraktom duvanskog dima indukuje ekspresiju MMP9, a korišćeni su različiti model sistemi, različite koncentracije i načini pripreme CSC, kao i različite metode kojima je MMP9 detektovana. Usled varijacija u eksperimentalnom pristupu rezultati različitih studija su teško uporedivi (Vikman et al. 2009, Nair et al. 2006).

U fiziološkim uslovima, glavni izvor MMP9 u plućima su makrofazi. Zato su u našim eksperimentima korišćene ćelije U937 indukovane pomoću PMA, koji aktiviranjem protein kinaze C dovodi do diferencijacije monocita u makrofage. Nakon indukcije monocita U937 u makrofage, ćelije su stimulisane različitim količinama CSC. Uticaj ekstrakta duvanskog dima na ekspresiju gena MMP9 kao i na kvantitet sekretovane MMP9 meren je u istom eksperimentalnom sistemu na

nivou iRNK, metodom real time PCR, i na nivou enzimske aktivnosti, metodom želatinskog zimograma. Kao matrica za umnožavanje DNK poslužila je totalna RNK tretiranih ćelija, dok je medijum u kome su gajene ćelije korišćen za određivanje relativne količine sekretovanog proteina MMP9, posredno, određivanjem enzimske aktivnosti MMP9.

Na osnovu relativne kvantifikacije iRNK MMP9 metodom real-time PCR, ustanovili smo da je do najsnažnije indukcije transkripcije gena MMP9, i to približno šest puta više u odnosu na kalibrator, došlo kada su ćelije rasle u prisustvu 80 $\mu\text{g/mL}$ CSC. Pri tretmanu sa 40 $\mu\text{g/mL}$ CSC nivo indukcije je bio manji i iznosio je približno tri puta, dok je pri koncentraciji od 120 $\mu\text{g/mL}$ došlo do pada indukcije transkripcione aktivnosti na približno 5 puta. Jedno od mogućih objašnjenja je blaga citotoksičnost CSC pri tretmanu ćelija dozom od 120 $\mu\text{g/mL}$.

Aktivirani makrofazi proizvode dovoljnu količinu MMP9 koja se može detektovati metodom želatinskog zimograma, pri čemu se meri njena enzimaska aktivnost uz aproksimaciju da je količina sekretovanog enzima proporcionalna njegovoj aktivnosti. Metoda želatinskog zimograma je jednostavna, dostupna i osetljiva, mogu se detektovati pikomolarne količine ispitivanog proteina (Atkinson et al. 2003). Maksimalna želatinolitička aktivnost MMP9 dobijena je pri tretmanu ćelija U937 sa 40 $\mu\text{g/mL}$ CSC i dovela je do povećanja od približno dva puta u poređenju sa netretiranim ćelijama. Pri ovoj koncentraciji nije uočen citotoksični efekat, obzirom da je ćelijska vijabilnost bila slična netretiranim ćelijama. MMP9 poreklom iz ćelija tretiranih sa 80 $\mu\text{g/mL}$ CSC pokazivala je sličnu enzimsku aktivnost, dok je stimulacija sa 120 $\mu\text{g/mL}$ CSC uzrokovala smanjenje želatinolitičke aktivnosti na približno 1,3 puta. Metodom želatinskog zimograma detektovana je pro-MMP9, zimogena forma enzima od 92 kDa. Mada U937 ćelije sadrže potencijalne aktivatore pro-MMP9 forme, uslovi u kulturi ćelija su takvi da ne favorizuju aktivaciju pro-MMP9. Glavna regulacija ekspresije MMP9 odvija se na transkripcionom nivou, ali je njena ekspresija regulisana i na nivou sekrecije i aktivacije (Greenlee et al. 2007).

Aktivnost MMP9 merena metodom želatinskog zimograma, pri koncentraciji od 80 $\mu\text{g/mL}$ CSC, je u skladu sa rezultatom aktivacije promotora gena MMP9, dobijenim merenjem relativne luciferazne aktivnosti wt konstrukta pri istoj koncentraciji CSC. U oba slučaja povećanje iznosi dva puta u odnosu na odgovarajuću kontrolu. U luciferaznom eseju analizirana je aktivnost kompletnog promotorskog regiona gena

MMP9, a genotipizacijom ćelija linije U937 utvrđen je homozigotni -1562C genotip. Stoga rezultat dobijen metodom želatinskog zimograma dodatno potvrđuje rezultat dobijen luciferaznim esejom. Iako nemamo rezultate kvantifikacije želatinozne aktivnosti MMP9 nosioca heterozigotnog genotipa za koji je ustanovljeno da predstavlja faktor rizika za pojavu HOBP, možemo pretpostaviti da bi njena vrednost bila povećana 2,5 puta u odnosu wt varijantu u odsustvu dejstva CSC. Aproksimacija je izvedena na osnovu rezultata merenja promotorske aktivnosti konstrukata pGL-pMMP9C i pGL-pMMP9T luciferaznim esejima i enzimske aktivnosti MMP9 dobijene metodom želatinskog zimograma nakon stimulacije sa ekstraktom duvanskog dima.

Pošto je uticaj CSC na ekspresiju MMP9 merenjem enzimske aktivnosti kvantifikovan, bilo je moguće korelisati podatke dobijene kvantifikacijom enzimske aktivnosti sa indukcijom ekspresije MMP9 na transkripcionom nivou. Rezultati dobijeni u našoj studiji su pokazali da se najveća enzimska aktivnost MMP9 detektuje pri koncentraciji CSC od 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, i da sa daljim povećanjem koncentracije CSC na 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ njena aktivnost ostaje gotovo ista. Za razliku od toga, real-time PCR-om je pokazano da se maksimalna indukcija transkripcije MMP9 postiže pri tretmanu ćelija sa 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CSC, i ona je bila dva puta veća u odnosu na stimulaciju sa 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CSC. Želatinskim zimogramom je detektovana enzimska aktivnost MMP9 izlučene u medijum od strane ćelija, čiji broj može biti smanjen pri tretmanu sa 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CSC. Njena količina nije izražena relativno, za razliku od transkripcione aktivnosti MMP9 koja je izražena u odnosu na ekspresiju gena GAPDH i nezavisna je od broja ćelija koje su analizirane. Takođe, može se pretpostaviti da doza CSC od 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, izaziva pojačanu degradaciju pro-MMP9 u medijumu i time umanjuje njenu želatinolitičku aktivnost koja se detektuje zimogramom.

Mada je od ranije poznato da duvanski dim indukuje ekspresiju MMP9 u ovom radu tačno je određen odnos između koncentracije CSC i nivoa indukcije, što se može koristiti za poređenje ne samo sa drugim agensima koji dovode do njene indukcije ili supresije već i za ispitivanje supstanci sa antioksidativnim dejstvom imajući u vidu istaknutu ulogu MMP9 u patogenezi HOBP.

U našem radu smo ispitali dozno-zavisni odgovor MMP9 na tretman ekstraktom duvanskog dima i odredili maksimalnu indukciju ekspresije gena na nivou iRNK i enzimske aktivnosti MMP9. Rezultati dobijeni u studiji u kojoj je ispitivan uticaj

ekstrakta duvanskog dima na ekspresiju MMP9 u model sistemu makrofaga pacova su u delimičnoj saglasnosti sa rezultatima dobijenim u našoj studiji (Kim et al. 2009). U studiji Kim-a i saradnika korišćen je ekstrakt duvanskog dima pripreman propuštanjem dima cigarete kroz medijum, koji je zatim diluiran i korišćen za tretman ćelija. U prisustvu 2,5% ekstrakta duvanskog dima indukovana je transkripcije MMP9 tri puta u odnosu na netretirane makrofage, dok je enzimaska aktivnost bila povećana nešto manje od dva puta. Ovi rezultati su slični rezultatima našeg istraživanju dobijenim kada su ćelije U937 gajene u prisustvu 40 µg/mL CSC. U studiji Kim-a i saradnika tretman ćelija 5% ekstraktom duvanskog dima doveo je do supresije ekspresije MMP9, što je objašnjeno citotoksičnim efektom. U našem istraživanju, do inhibicije je došlo kada su ćelije tretirane sa 120 µg/mL CSC. Iako postoje razlike u nivou indukcije ekspresije MMP9 u zavisnosti od primene različitih ekstrakata duvanskog dima, trend promene ekspresije MMP9 je sličan. Uočene razlike se mogu pripisati različitim načinima pripreme ekstrakata. Na primer u studiji Kim-a i saradnika korišćen je sveže pripremljen ekstrakt duvanskog dima, dobijen propuštanjem dima kroz medijum, dok je u našoj studiji korišćen ekstrakt duvanskog dima dobijen rastvaranjem faze katrana u DMSO. Obzirom da faza katrana nije istog sastava kao i faza gasa duvanskog dima, sadržaj komponenti na koje je promotor MMP9 osetljiv može da varira.

U ovom radu je pokazano da se plato u ekspresiji MMP9 nakon stimulacije CSC dostiže pri dozi od 80 µg/mL CSC. Pri većim dozama detektovano je smanjenje ekspresije MMP9, a jedan od razloga može biti citotoksičnost komponenti ekstrakta duvanskog dima. Citotoksičnost se definiše kao svojstvo hemijskog jedinjenja da izazove smrt ćelije, nezavisno od mehanizma dejstva. Citotoksično dejstvo ekstrakta duvanskog dima na ćelije U937 tretirane sa 80 µg/mL i 120 µg/mL CSC je analizirano korišćenjem dve metode: brojanjem živih ćelija bojenih tripan plavim i merenjem vijabilnosti ćelija MTT testom. Obe metode su pokazale smanjenje ćelijske vijabilnosti nakon tretmana CSC. Brojanjem ćelija bojenih tripan plavim ustanovljeno je da se broj živih ćelija smanjio značajno, za približno 50% pri tretmanima sa 80 µg/mL i 120 µg/mL CSC. MTT testom je utvrđeno smanjenje vijabilnosti na 83% pri tretmanu od 80 µg/mL CSC i 71,3% pri tretmanu od 120 µg/mL CSC. Jedan od razloga za neslaganje rezultata dobijenih različitim metodama može biti usled razlike u osetljivosti primenjenih testova. Određivanje vijabilnosti ćelija bojenjem tripan plavim se bazira na proceni integriteta ćelijske membrane i nije dovoljno osetljivo, za razliku od MTT testa, koji je senzitivniji i

zasniva se na merenju aktivnosti dehidrogenaza mitohondrija živih ćelija. Na osnovu podataka iz literature (Lönnroth 2005) procenjeno je da je citotoksičnost ekstrakta duvanskog dima koji je korišćen u ovom radu (doze od 80 i 120 µg/mL) blaga jer je smanjenje vijabilnosti iznosilo od 60-90%. Takođe, količine CSC koje su korišćene u publikovanim radovima daleko prevazilaze vrednosti korišćene u našem istraživanju i kreću se i do 500 µg/mL CSC (van Leeuwen et al. 2005).

6. Zaključci

1. Genske varijante: CYP1A1 *1A/*2A, CYP2E1 *1A/*5B, GSTM1 -/-, GSTT1 -/-, GSTP1 Ile105Val i mEPHX S i F, gena uključenih u ravnotežu oksidanti-antioksidanti, ne predstavljaju pojedinačne faktore rizika za nastanak HOBP.
2. Distribucija genske varijante CYP2E1 *5B ukazuje na njenu protektivnu ulogu u nastanku HOBP kod pušača.
3. Genske varijante: MMP1 G-1607GG, MMP12 A-82G i α_1 AT PI Z i PI S, gena uključenih u remodelovanje međućelijskog matriksa, ne predstavljaju pojedinačne faktore rizika za nastanak HOBP.
4. Genotip MMP9 -1562CT predstavlja faktor rizika od 2,57 za pojavu HOBP.
5. Genotip -308GG gena TNF α , uključenog u inflamaciju, predstavlja faktor rizika od 2,44 za nastanak HOBP, dok prisustvo alela -308A ima protektivnu ulogu i smanjuje faktor rizika za pojavu bolesti približno dva puta.
6. Genske varijante: F508del, M470V i 5T, gena CFTR uključenog u mukocilijarni klirens, ne predstavljaju pojedinačne faktore rizika za nastanak HOBP.
7. Distribucija genske varijante R75Q gena CFTR ukazuje na udruženost ove varijante sa HOBP.
8. U ovoj studiji identifikovana je udruženost sledećih gen-gen interakcija sa HOBP:
 - GSTM1:MMP9 složeni genotip -/-:C/T predstavlja faktor rizika od 2,61 za nastanak HOBP,
 - GSTM1:TNF α složeni genotip -/-:G/G predstavlja faktor rizika od 2,12 za nastanak HOBP,
 - GSTM1:CFTR složeni genotip -/-:wt/F508del predstavlja faktor rizika od 10,96 za nastanak HOBP,
 - MMP9:TNF α složeni genotip C/T:G/G predstavlja faktor rizika od 2,74 za nastanak HOBP,
 - MMP12:TNF α složeni genotip A/A:G/G predstavlja faktor rizika od 2,58 za nastanak HOBP,
 - MMP9:CFTR složeni genotip C/T:wt/F508del predstavlja faktor rizika od 10,96 za nastanak HOBP i

Zaključci

TNF α :CFTR složeni genotip G/G:wt/F508del predstavlja faktor rizika od 13,56 za nastanak HOBP.

9. Identifikovana je udruženost novih interakcija tri gena sa HOBP:

CYP1A1:GSTM1:mEPHX složeni genotip *1A/*2A:-/-:S/(S) predstavlja faktor rizika od 7,42 za nastanak HOBP,

CYP1A1:MMP9:TNF α složeni genotip *1A/*2A:T/(T):G/G predstavlja faktor rizika od 5,03 za nastanak HOBP,

GSTM1:GSTP1:TNF α složeni genotip -/-:Val/(Val):G/G predstavlja faktor rizika od 2,46 za nastanak HOBP,

GSTM1:MMP9:TNF α složeni genotip -/-:T/(T):G/G predstavlja faktor rizika od 4,03 za nastanak HOBP,

GSTM1:MMP12:TNF α složeni genotip -/-:A/A:G/G predstavlja faktor rizika od 1,97 za nastanak HOBP i

GSTT1:MMP9:TNF α složeni genotip -/-:T/(T):G/G predstavlja faktor rizika od 9,53 za nastanak HOBP.

10. Prisustvo alela 470V na jednom ili oba CFTR gena predstavlja protektivni faktor za pojavu teške HOBP. Nosioци alela 470V imaju 5,5 puta manju šansu da obole od težeg oblika bolesti.

11. Duvanski dim ostvaruje stimulatorni efekat na obrazac odgovora varijante C-1562T gena MMP9.

12. Koncentracija CSC od 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dovodi do maksimalne indukcije transkripcije gena MMP9, dok koncentracija CSC od 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dovodi do maksimalne aktivnosti enzima MMP9 na ćelijama U937.

7. Literatura

Abboud RT, Wallace AM, English JC, Müller NL, Coxson H, Paré PD, Sandford AJ. Relationship of matrix metalloproteinase mRNA expression and genetic polymorphisms to emphysema. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(6):475.

Arand M, Mühlbauer R, Hengstler J, Jäger E, Fuchs J, Winkler L, Oesch F. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal Biochem.* 1996;236:184-6.

Arif E, Vibhuti A, Alam P, Deepak D, Singh B, Athar M, Pasha MA. Association of CYP2E1 and NAT2 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chim Acta.* 2007;382(1-2):37-42.

Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(1):12-24.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J.* 2003;22(4):672-88.

Beane J, Sebastiani P, Liu G, Brody JS, Lenburg ME, Spira A. Reversible and permanent effects of tobacco smoke exposure on airway epithelial gene expression. *Genome Biol.* 2007;8(9):R201.

Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res.* 2003;52(3):95-1.

Boezen HM. Genome-wide association studies: what do they teach us about asthma and chronic obstructive pulmonary disease? *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6(8):701-3.

Bolt HM, Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr Drug Metab.* 2006;7(6):613-28.

Bombieri C, Benetazzo M, Saccomani A, Belpinati F, Gile LS, Luisetti M, Pignatti PF. Complete mutational screening of the CFTR gene in 120 patients with pulmonary disease. *Hum Genet.* 1998;103(6):718-22.

Budhi A, Hiyama K, Isobe T, Oshima Y, Hara H, Maeda H, Kohno N. Genetic susceptibility for emphysematous changes of the lung in Japanese. *Int J Mol Med.* 2003;11(3):321-9.

- Button B, Boucher RC. University of North Carolina Virtual Lung Group. Role of mechanical stress in regulating airway surface hydration and mucus clearance rates. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008;163(1-3):189-201.
- Calikoglu M, Tamer L, Ates Aras N, Karakaş S, Ercan B. The association between polymorphic genotypes of glutathione S-transferases and COPD in the Turkish population. *Biochem Genet.* 2006;44(7-8):307-19.
- Cantin AM, Bilodeau G, Ouellet C, Liao J, Hanrahan JW. Oxidant stress suppresses CFTR expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(1):C262-70.
- Cantlay AM, Lamb D, Gillooly M, Norrman J, Morrison D, Smith CA, Harrison DJ. Association between the CYP1A1 gene polymorphism and susceptibility to emphysema and lung cancer. *Clin Mol Pathol.* 1995;48(4):M210-4.
- Casals T, De-Gracia J, Gallego M, Dorca J, Rodríguez-Sanchón B, Ramos MD, Giménez J, Cisteró-Bahima A, Oliveira C, Estivill X. Bronchiectasis in adult patients: an expression of heterozygosity for CFTR gene mutations? *Clin Genet.* 2004;65(6):490-5.
- Castell JV, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol.* 2005;57(Suppl 1):189-204.
- Cecil RL, Goldman L, Bennett JC. Udžbenik Interne medicine. Slavjanskaja: Vojnoizdavački zavod. Beograd, 2007.
- Celedón JC, Lange C, Raby BA, Litonjua AA, Palmer LJ, DeMeo DL, Reilly JJ, Kwiatkowski DJ, Chapman HA, Laird N, Sylvia JS, Hernandez M, Speizer FE, Weiss ST, Silverman EK. The transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum Mol Genet.* 2004;13(15):1649-56.
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* 2003;253(1-2):269-85.
- Cheng SL, Yu CJ, Chen CJ, Yang PC. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD. *Eur Respir J.* 2004;23(6):818-24.
- Cheng SL, Yu CJ, Yang PC. Genetic polymorphisms of cytochrome p450 and matrix metalloproteinase in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Genet.* 2009;47(7-8):591-601.
- Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J.* 2008;31(6):1334-56.
- Ciencewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(3):456-68.

- Ciminelli BM, Bonizzato A, Bombieri C, Pompei F, Gabaldo M, Ciccacci C, Beghini A, Holubova A, Zorzi P, Piskackova T, Macek M Jr, Castellani C, Modiano G, Pignatti PF. Highly preferential association of NonF508del CF mutations with the M470 allele. *J Cyst Fibros.* 2007;6(1):15-22.
- Cohen BH. Chronic obstructive pulmonary disease: a challenge in genetic epidemiology. *Am J Epidemiol.* 1980;112(2):274-88.
- Cookson WO. State of the art. Genetics and genomics of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(6):473-5.
- Córdoba-Lanús E, de-Torres JP, López-Aguilar C, Rodríguez-Pérez MC, Maca-Meyer N, Montejo-de-Garcini A, Aguirre-Jaime A, Pérez-Méndez L, Casanova C. Association of IL-6 gene polymorphisms and COPD in a Spanish population. *Respir Med.* 2008;102(12):1805-11.
- Costes B, Fanen P, Goossens M, Ghanem N. A rapid, efficient, and sensitive assay for simultaneous detection of multiple cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat.* 1993;2(3):185-91.
- Culpitt SV, Rogers DF, Traves SL, Barnes PJ, Donnelly LE. Sputum matrix metalloproteinases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Respir Med.* 2005;99(6):703-10.
- Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nilius B, Cassiman JJ. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest.* 1998;101(2):487-96.
- Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Lange P, Nordestgaard BG. Asthma and COPD in cystic fibrosis intron-8 5T carriers. A population-based study. *Respir Res.* 2005;6:113.
- Daly AK. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17(1):27-41.
- D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y, Berg RA, Chada K. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell.* 1992;71(6):955-61.
- Demacq C, de Souza AP, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase (MMP)-9 does not affect plasma MMP-9 activity in healthy subjects. *Clin Chim Acta.* 2006;365(1-2):183-7.
- Divac A, Nikolic A, Mitic-Milicic M, Nagorni-Obradovic L, Petrovic-Stanojevic N, Dopudja-Pantic V, Nadaskic R, Savic A, Radojkovic D. High frequency of the R75Q CFTR variation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Cyst Fibros.* 2004;3(3):189-91.

- Dork T, Dworniczak B, Aulehla-Scholz C, Wieczorek D, Bohm I, Mayerova A, Seydewitz HH, Nieschlag E, Meschede D, Horst J, Pander HJ, Sperling H, Ratjen F, Passarge E, Schmidtke J, Stuhmann. Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens. *Hum Genet.* 1997;100(3-4):365-77.
- Fanen P, Ghanem N, Vidaud M, Besmond C, Martin J, Costes B, Plassa F, Goossens M. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. *Genomics.* 1992;13(3):770-6.
- Ferrarotti I, Zorzetto M, Beccaria M, Gilè LS, Porta R, Ambrosino N, Pignatti PF, Cerveri I, Pozzi E, Luisetti M. Tumour necrosis factor family genes in a phenotype of COPD associated with emphysema. *Eur Respir J.* 2003;21(3):444-9.
- Filipović M, Đinđić B, Cekić S. Patogeneza hronične opstruktivne bolesti pluća. *Acta Med Median.* 2006;45(1):73-81.
- Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(1):240-7.
- Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J.* 1977;1(6077):1645-8.
- Friedman KJ, Highsmith WE Jr, Silverman LM. Detecting multiple cystic fibrosis mutations by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem.* 1991;37(5):753-5.
- Fujiki K, Ishiguro H, Ko SB, Mizuno N, Suzuki Y, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Kitagawa M, Hayakawa T, Sakai Y, Takayama T, Saito M, Kondo T, Naruse S. Genetic evidence for CFTR dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis. *J Med Genet.* 2004;41(5):e55.
- Gaspar P, Moreira J, Kvitko K; Torres M, Moreira A, Weimer T. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genet Mol Biol.* 2004;27(2):133-8.
- GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease). Pocket Guide to COPD Diagnosis, Management and Prevention. A Guide for Health Care Professionals. 2006.
- Gough JA, Murray NE. Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol.* 1983;166(1):1-19.

- Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev.* 2007;87(1):69-98.
- Groskreutz D, Schenborn ET. Reporter systems. *Methods Mol Biol.* 1997;63:11-30.
- Guênégou A, Leynaert B, Bénessiano J, Pin I, Demoly P, Neukirch F, Boczkowski J, Aubier M. Association of lung function decline with the heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism in a general population sample. Results from the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS), France. *J Med Genet.* 2006;43(8):e43.
- Halbert RJ, Isonaka S, George D, Iqbal A. Interpreting COPD prevalence estimates: what is the true burden of disease? *Chest.* 2003;123(5):1684-92.
- Haq I, Chappell S, Johnson SR, Lotya J, Daly L, Morgan K, Guetta-Baranes T, Roca J, Rabinovich R, Millar AB, Donnelly SC, Keatings V, MacNee W, Stolk J, Hiemstra PS, Miniati M, Monti S, O'Connor CM, Kalsheker N. Association of MMP-2 polymorphisms with severe and very severe COPD: a case control study of MMPs-1, 9 and 12 in a European population. *BMC Med Genet.* 2010;11:7.
- Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet.* 1994;3(3):421-8.
- Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science.* 1997;277(5334):2002-4.
- Hayashi¹ S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J Biochem.* 1991;110(3):407-11.
- Hayashi² S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem.* 1991;110(4):559-65.
- He JQ, Ruan J, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, Sandford AJ. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(3):323-8.
- Hegab AE, Sakamoto T, Saitoh W, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, Sekizawa K. Polymorphisms of IL4, IL13, and ADRB2 genes in COPD. *Chest.* 2004;126(6):1832-9.
- Hegab AE, Sakamoto T, Saitoh W, Nomura A, Ishii Y, Morishima Y, Iizuka T, Kiwamoto T, Matsuno Y, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, Sekizawa K. Polymorphisms of TNFalpha, IL1beta, and IL1RN genes in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329(4):1246-52.

- Hersh CP, Demeo DL, Lange C, Litonjua AA, Reilly JJ, Kwiatkowski D, Laird N, Sylvia JS, Sparrow D, Speizer FE, Weiss ST, Silverman EK. Attempted replication of reported chronic obstructive pulmonary disease candidate gene associations. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33(1):71-8.
- Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem.* 1980;102(1):196-202.
- Higham MA, Pride NB, Alikhan A, Morrell NW. Tumour necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2000;15(2):281-4.
- Huang SL, Su CH, Chang SC. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(5):1436-9.
- Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, Chang FY, Lee SD. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology.* 2003;37(4):924-30.
- Hukkanen J, Pelkonen O, Hakkola J, Raunio H. Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit Rev Toxicol.* 2002;32(5):391-411.
- Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, Soto-Quiros ME, Avila L, Lasky-Su J, Stidley C, Melén E, Söderhäll C, Hallberg J, Kull I, Kere J, Svartengren M, Pershagen G, Wickman M, Lange C, Demeo DL, Hersh CP, Klanderman BJ, Raby BA, Sparrow D, Shapiro SD, Silverman EK, Litonjua AA, Weiss ST, Celedón JC. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *N Engl J Med.* 2009;361(27):2599-608.
- Imai K, Dalal SS, Chen ES, Downey R, Schulman LL, Ginsburg M, D'Armiento J. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(3 Pt 1):786-91.
- Imboden M, Downs SH, Senn O, Matyas G, Brändli O, Russi EW, Schindler C, Ackermann-Liebrich U, Berger W, Probst-Hensch NM; SAPALDIA Team. Glutathione S-transferase genotypes modify lung function decline in the general population: SAPALDIA cohort study. *Respir Res.* 2007;8:2.
- Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Miyao M, Hosoi T, Takahashi H, Fukuchi Y, Ouchi Y. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1999;54(8):693-6.

- Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Miyao M, Hosoi T, Takahashi H, Fukuchi Y, Ouchi Y. Neither IL-1beta, IL-1 receptor antagonist, nor TNFalpha polymorphisms are associated with susceptibility to COPD. *Respir Med.* 2000;94(9):847-51.
- Ito I, Nagai S, Handa T, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Mishima M. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(11):1378-82.
- Jeng JE, Tsai JF, Chuang LY, Ho MS, Lin ZY, Hsieh MY, Chen SC, Chuang WL, Wang LY, Yu ML, Dai CY, Chang JG. Tumor necrosis factor-alpha 308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma. *Neoplasia.* 2007;9(11):987-92.
- Joos L, He JQ, Shepherdson MB, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, Sandford AJ. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet.* 2002;11(5):569-76.
- Jormsjö S, Ye S, Moritz J, Walter DH, Dimmeler S, Zeiher AM, Henney A, Hamsten A, Eriksson P. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease. *Circ Res.* 2000;86(9):998-1003.
- Jouneau S, Léveillé G, Caulet-Maugendre S, Brinchault G, Belleguic C, Desrues B, Lagente V. Matrix Metalloproteinases in Tissue Remodelling and Inflammation. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in cystic fibrosis. A Birkhäuser Basel book. Basel, 2008.
- Kaplan J, Calame K. The Zn/POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(6):1108-16.
- Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, Weston A, Harris CC. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res.* 1992;52(23):6712-5.
- Kato S, Tajiri T, Matsukura N, Matsuda N, Tani N, Mamada H, Yoshida H, Kiyama T, Naito Z. Genetic polymorphisms of aldehyde dehydrogenase 2, cytochrome p450 2E1 for liver cancer risk in HCV antibody-positive Japanese patients and the variations of CYP2E1 mRNA expression levels in the liver due to its polymorphism. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38(8):886-93.
- Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N, Watanabe J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene. *FEBS Lett.* 1990;263(1):131-3.

- Kim JH, Lee KH, Yoo DH, Kang D, Cho SH, Hong YC. GSTM1 and TNFalpha gene polymorphisms and relations between blood lead and inflammatory markers in a non-occupational population. *Mutat Res.* 2007;629(1):32-9.
- Kim SE, Thanh Thuy TT, Lee JH, Ro JY, Bae YA, Kong Y, Ahn JY, Lee DS, Oh YM, Lee SD, Lee YS. Simvastatin inhibits induction of matrix metalloproteinase-9 in rat alveolar macrophages exposed to cigarette smoke extract. *Exp Mol Med.* 2009;41(4):277-87.
- Kim WD, Eidelman DH, Izquierdo JL, Ghezzi H, Saetta MP, Cosio MG. Centrilobular and panlobular emphysema in smokers. Two distinct morphologic and functional entities. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144(6):1385-90.
- Körkkö J, Annunen S, Pihlajamaa T, Prockop DJ, Ala-Kokko L. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(4):1681-5.
- Korytina GF, Yanbaeva DG, Babenkova LI, Etkina EI, Victorova TV. Genetic polymorphisms in the cytochromes P-450 (1A1, 2E1), microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genes, and their relationship with chronic bronchitis and relapsing pneumonia in children. *J Mol Med.* 2005;83(9):700-10.
- Krauter G, Von der Lieth CW, Schmidt R, Hecker E. Structure/activity relationships of polyfunctional diterpenes of the tiglane type. A pharmacophore model for protein-kinase-C activators based on structure/activity studies and molecular modeling of the tumor promoters 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate and 3-O-tetradecanoylgingerol. *Eur J Biochem.* 1996;242(2):417-27.
- Krauth C, Jalilvand N, Welte T, Busse R. Cystic fibrosis: cost of illness and considerations for the economic evaluation of potential therapies. *Pharmacoeconomics.* 2003;21(14):1001-24.
- Kueppers F, Miller RD, Gordon H, Hepper NG, Offord K. Familial prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in a matched pair study. *Am J Med.* 1977;63(3):336-42.
- Landi MT, Bertazzi PA, Shields PG, Clark G, Lucier GW, Garte SJ, Cosma G, Caporaso NE. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans. *Pharmacogenetics.* 1994;4(5):242-6.
- Lanone S, Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Ma B, Chen Q, Homer RJ, Wang J, Rabach LA, Rabach ME, Shipley JM, Shapiro SD, Senior RM, Elias JA. Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Clin Invest.* 2002;110(4):463-74.

- Lavigne MC, Eppihimer MJ. Cigarette smoke condensate induces MMP-12 gene expression in airway-like epithelia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;330(1):194-203.
- Lavigne MC, Thakker P, Gunn J, Wong A, Miyashiro JS, Wasserman AM, Wei SQ, Pelker JW, Kobayashi M, Eppihimer MJ. Human bronchial epithelial cells express and secrete MMP-12. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324(2):534-46.
- Lázaro C, de Cid R, Sunyer J, Soriano J, Giménez J, Alvarez M, Casals T, Antó JM, Estivill X. Missense mutations in the cystic fibrosis gene in adult patients with asthma. *Hum Mutat.* 1999;14(6):510-9.
- Lewitter FI, Tager IB, McGue M, Tishler PV, Speizer FE. Genetic and environmental determinants of level of pulmonary function. *Am J Epidemiol.* 1984;120(4):518-30.
- Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung KF. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(4 Pt 1):1355-60.
- Lindgren A, Stroh E, Montnémery P, Nihlén U, Jakobsson K, Axmon A. Traffic-related air pollution associated with prevalence of asthma and COPD/chronic bronchitis. A cross-sectional study in Southern Sweden. *Int J Health Geogr.* 2009;8:2.
- Linsdell P, Hanrahan JW. Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol.* 1998;275(1 Pt 1):C323-6.
- Liu CJ, Wong YK, Chang KW, Chang HC, Liu HF, Lee YJ. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(10):608-12.
- Lomas DA. Genetic predisposition to chronic obstructive pulmonary disease: advances in alpha1-antitrypsin deficiency and the serpinopathies. *Clin Med.* 2007;7(5):446-7.
- Lönnroth EC. Toxicity of medical glove materials: a pilot study. *Int J Occup Saf Ergon.* 2005;11(2):131-9.
- Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med.* 1998;4(11):1241-3.
- Lucotte G, Sesboüé R. Polymerase chain reaction detection of S and Z alpha-1-antitrypsin variants by duplex PCR assay. *Mol Cell Probes.* 1999;13(5):389-91.

- Ma Z, Shah RC, Chang MJ, Benveniste EN. Coordination of cell signaling, chromatin remodeling, histone modifications, and regulator recruitment in human matrix metalloproteinase 9 gene transcription. *Mol Cell Biol.* 2004;24(12):5496-509.
- MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest.* 2000;117(5 Suppl 1):303S-17S.
- MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol.* 2001;429(1-3):195-207.
- MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(4):258-66.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual* Second Edition. Cold Spring Harbor Lab. New York, 1989.
- Marchand LL, Wilkinson GR, Wilkens LR. Genetic and dietary predictors of CYP2E1 activity: a phenotyping study in Hawaii Japanese using chlorzoxazone. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(6):495-500.
- Martey CA, Baglole CJ, Gasiewicz TA, Sime PJ, Phipps RP. The aryl hydrocarbon receptor is a regulator of cigarette smoke induction of the cyclooxygenase and prostaglandin pathways in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289(3):L391-9.
- Matheson MC, Ellis JA, Raven J, Walters EH, Abramson MJ. Association of IL8, CXCR2 and TNFalpha polymorphisms and airway disease. *J Hum Genet.* 2006;51(3):196-203.
- Menshikov M, Torosyan N, Elizarova E, Plakida K, Vorotnikov A, Parfyonova Y, Stepanova V, Bobik A, Berk B, Tkachuk V. Urokinase induces matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression in THP-1 monocytes via ERK1/2 and cytosolic phospholipase A2 activation and eicosanoid production. *J Vasc Res.* 2006;43(5):482-90.
- Mercer BA, Wallace AM, Brinckerhoff CE, D'Armiento JM. Identification of a cigarette smoke-responsive region in the distal MMP-1 promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40(1):4-12.
- Minematsu N, Nakamura H, Tateno H, Nakajima T, Yamaguchi K. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(1):116-9.
- Moon SK, Cha BY, Kim CH. ERK1/2 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway. *J Cell Physiol.* 2004;198(3):417-27.

- Nair AS, Shishodia S, Ahn KS, Kunnumakkara AB, Sethi G, Aggarwal BB. Deguelin, an Akt inhibitor, suppresses I κ B α kinase activation leading to suppression of NF- κ B-regulated gene expression, potentiation of apoptosis, and inhibition of cellular invasion. *J Immunol*. 2006;177(8):5612-22.
- Nikolic A, Divac A, Stankovic M, Dinic J, Tomic B, Ljubic M. Analysis of common CFTR polymorphisms 5T, M470V and R75Q in healthy Serbian population. *Genetika*. 2006;42(7):996-8.
- Noone PG, Knowles MR. 'CFTR-opathies': disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. *Respir Res*. 2001;2(6):328-32.
- Numoto M, Yokoro K, Koshi J. ZF5, which is a Kruppel-type transcriptional repressor, requires the zinc finger domain for self-association. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;256(3):573-8.
- Palaparti A, Baratz A, Stifani S. The Groucho/transducin-like enhancer of split transcriptional repressors interact with the genetically defined amino-terminal silencing domain of histone H3. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26604-10.
- Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res*. 2001;2(1):10-9.
- Patuzzo C, Gilè LS, Zorzetto M, Trabetti E, Malerba G, Pignatti PF, Luisetti M. Tumor necrosis factor gene complex in COPD and disseminated bronchiectasis. *Chest*. 2000;117(5):1353-8.
- Pierce RA, Sandefur S, Doyle GA, Welgus HG. Monocytic cell type-specific transcriptional induction of collagenase. *J Clin Invest*. 1996;97(8):1890-9.
- Pierrou S, Broberg P, O'Donnell RA, Pawłowski K, Virtala R, Lindqvist E, Richter A, Wilson SJ, Angco G, Möller S, Bergstrand H, Koopmann W, Wieslander E, Strömstedt PE, Holgate ST, Davies DE, Lund J, Djukanovic R. Expression of genes involved in oxidative stress responses in airway epithelial cells of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(6):577-86.
- Pilewski JM, Frizzell RA. Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev*. 1999;79(1 Suppl):S215-55.
- Pompei F, Ciminelli BM, Bombieri C, Ciccacci C, Koudova M, Giorgi S, Belpinati F, Begnini A, Cerny M, Des Georges M, Claustres M, Ferec C, Macek M Jr, Modiano G, Pignatti PF. Haplotype block structure study of the CFTR gene. Most variants are associated with the M470 allele in several European populations. *Eur J Hum Genet*. 2006;14(1):85-93.
- Popović S, Piletić O, Mršević D, Čanković J, Lačković V, Đorđević V, Japundžić M, Mujović S, Unković N. *Histologija. Dečje novine*. Gornji Milanovac, 1988.

- Radojkovic D, Kusic J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clin Chem*. 2000;46(6 Pt 1):883-4.
- Ragg SJ, Kaga S, Berg KA, Ochi A. The mitogen-activated protein kinase pathway inhibits ceramide-induced terminal differentiation of a human monoclonal leukemia cell line, U937. *J Immunol*. 1998;161(3):1390-8.
- Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J*. 2006;28(1):219-42.
- Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol*. 2003;36(1):95-109.
- Ralph P, Moore MA, Nilsson K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med*. 1976;143(6):1528-33.
- Ratjen F, Hartog CM, Paul K, Wermelt J, Braun J. Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha. *Thorax*. 2002;57(11):930-4.
- Ravnik-Glavac M, Glavac D, di Sant 'Agnese P, Chernick M, Dean M. Cystic fibrosis gene mutations detected in hereditary pancreatitis. *Pflugers Arch*. 1996;431(6 Suppl 2):R191-2.
- Redline S, Tishler PV, Rosner B, Lewitter FI, Vandenburg M, Weiss ST, Speizer FE. Genotypic and phenotypic similarities in pulmonary function among family members of adult monozygotic and dizygotic twins. *Am J Epidemiol*. 1989;129(4):827-36.
- Rennard SI, Vestbo J. COPD: the dangerous underestimate of 15%. *Lancet*. 2006;367(9518):1216-9.
- Research Cigarettes. Tobacco and Health Research Institute. The University of Kentucky printing Services. Lexington, 1990.
- Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol*. 1993;75(6):2419-24.
- Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;352(19):1992-2001.
- Ruse CE, Hill MC, Tobin M, Neale N, Connolly MJ, Parker SG, Wardlaw AJ. Tumour necrosis factor gene complex polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2007;101(2):340-4.

- Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;26(5):602-9.
- Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res.* 1998;58(23):5321-5.
- Sakao S, Tatsumi K, Igari H, Shino Y, Shirasawa H, Kuriyama T. Association of tumor necrosis factor alpha gene promoter polymorphism with the presence of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(2):420-2.
- Sampsonas F, Karkoulias K, Kaparianos A, Spiropoulos K. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease, beyond a1-antitrypsin deficiency. *Curr Med Chem.* 2006;13(24):2857-73.
- Sandford AJ, Weir TD, Paré PD. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 1997;10(6):1380-91.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
- Schirmer H, Basso da Silva L, Teixeira PJ, Moreira JS, Moreira AL, Simon D. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms: lack of association with chronic obstructive pulmonary disease in a Brazilian population. *Genet Mol Res.* 2009;8(3):1028-34.
- Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest.* 2000;117(3):684-94.
- Seifart¹ C, Dempfle A, Plagens A, Seifart U, Clostermann U, Müller B, Vogelmeier C, von Wichert P. TNFalpha-, TNFbeta-, IL-6-, and IL-10-promoter polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Tissue Antigens.* 2005;65(1):93-100.
- Seifart² C, Plagens A, Dempfle A, Clostermann U, Vogelmeier C, von Wichert P, Seifart U. TNF-alpha, TNF-beta, IL-6, and IL-10 polymorphisms in patients with lung cancer. *Dis Markers.* 2005;21(3):157-65.
- Shih CM, Lee YL, Chiou HL, Chen W, Chang GC, Chou MC, Lin LY. Association of TNF-alpha polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2006;52(1):15-20.

Shishodia S, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by suppressing activation of IkappaBalpha kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9. *Cancer Res.* 2004;64(14):5004-12.

Shrimpton AE. R117H and IVS8-5T cystic fibrosis mutation detection by restriction enzyme digestion. *Mol Diagn.* 2000;5(3):235-8.

Silverman EK, Palmer LJ. Case-control association studies for the genetics of complex respiratory diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;22(6):645-8.

Silverman EK, Spira A, Paré PD. Genetics and genomics of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6(6):539-42.

Silverman EK. Progress in chronic obstructive pulmonary disease genetics. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(5):405-8.

Silverman¹ EK, Palmer LJ, Mosley JD, Barth M, Senter JM, Brown A, Drazen JM, Kwiatkowski DJ, Chapman HA, Campbell EJ, Province MA, Rao DC, Reilly JJ, Ginns LC, Speizer FE, Weiss ST. Genomewide linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet.* 2002;70(5):1229-39.

Silverman² EK, Mosley JD, Palmer LJ, Barth M, Senter JM, Brown A, Drazen JM, Kwiatkowski DJ, Chapman HA, Campbell EJ, Province MA, Rao DC, Reilly JJ, Ginns LC, Speizer FE, Weiss ST. Genome-wide linkage analysis of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease: airflow obstruction and chronic bronchitis phenotypes. *Hum Mol Genet.* 2002;11(6):623-32.

Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet.* 1997;350(9078):630-3.

Souza-Tarla CD, Uzuelli JA, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem.* 2005;38(5):410-4.

Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Strominger JL. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(22):8699-702.

Stankovic M, Nikolic A, Divac A, Mitic-Milicic M, Nagorni-Obradovic Lj, Radojkovic D. Association of polymorphisms in xenobiotic metabolism genes in patients with COPD. *International Free Radical Summer School 2006: Biomarkers of oxidative stress and responses.* Spetses Island, Greece September 30-October 6, 2006.

- Stankovic M, Nikolic A, Divac A, Tomovic A, Petrovic-Stanojevic N, Andjelic M, Dopudja-Pantic V, Surlan M, Vujicic I, Ponomarev D, Mitic-Milikic M, Kusic J, Radojkovic D. The CFTR M470V gene variant as a potential modifier of COPD severity: study of Serbian population. *Genet Test*. 2008;12(3):357-62.
- Stankovic¹ MM, Nestorovic AR, Tomovic AM, Petrovic-Stanojevic ND, Andjelic MS, Dopudja-Pantic VB, Nagorni-Obradovic LjM, Mitic-Milikic MM, Radojkovic DP. TNF α -308 promotor polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Neoplasma*. 2009;56(4):348-52.
- Stankovic² M, Nikolic A, Divac A, Rakicevic L, Tomovic A, Mitic-Milikic M, Nagorni-Obradovic L, Grujic M, Petrovic-Stanojevic N, Andjelic-Jelic M, Dopudja-Pantic V, Radojkovic D. Matrix metalloproteinases gene variants in idiopathic disseminated bronchiectasis. *J Investig Med*. 2009;57(3):500-3.
- Stockley RA, Mannino D, Barnes PJ. Burden and pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(6):524-6.
- Sun G, Stacey MA, Vittori E, Marini M, Bellini A, Kleimberg J, Mattoli S. Cellular and molecular characteristics of inflammation in chronic bronchitis. *Eur J Clin Invest*. 1998;28(5):364-72.
- Sundberg K, Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Seidel A, Mannervik B, Jernström B. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*. 1998;19(3):433-6.
- Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*. 1976;17(5):565-77.
- Šerban NM. Pokretne i nepokretne ćelije. Savremena administracija. Beograd, 1995.
- Tesfaigzi Y, Myers OB, Stidley CA, Schwalm K, Picchi M, Crowell RE, Gilliland FD, Belinsky SA. Genotypes in matrix metalloproteinase 9 are a risk factor for COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2006;1(3):267-78.
- Thier R, Brüning T, Roos PH, Rihs HP, Golka K, Ko Y, Bolt HM. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int J Hyg Environ Health*. 2003;206(3):149-71.
- Toth M, Fridman R. Metastasis Research Protocols. *Methods in Molecular Medicine. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography*. 2001;57(I):163-174.

- Tzetis M, Efthymiadou A, Strofalis S, Psychou P, Dimakou A, Pouliou E, Doudounakis S, Kanavakis E. CFTR gene mutations--including three novel nucleotide substitutions--and haplotype background in patients with asthma, disseminated bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Genet.* 2001;108(3):216-21.
- Tzortzaki EG, Siafakas NM. Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur Respir Mon.* 2006;38:84-99.
- Upadhyaya KR, Radha KS, Madhyastha HK. Cell cycle regulation and induction of apoptosis by beta-carotene in U937 and HL-60 leukemia cells. *J Biochem Mol Biol.* 2007;40(6):1009-15.
- van der Pouw Kraan TC, Küçükaycan M, Bakker AM, Baggen JM, van der Zee JS, Dentener MA, Wouters EF, Verweij CL. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with the -1055 IL-13 promoter polymorphism. *Genes Immun.* 2002;3(7):436-9.
- van Leeuwen DM, Gottschalk RW, van Herwijnen MH, Moonen EJ, Kleinjans JC, van Delft JH. Differential gene expression in human peripheral blood mononuclear cells induced by cigarette smoke and its constituents. *Toxicol Sci.* 2005;86(1):200-10.
- Vibhuti A, Arif E, Deepak D, Singh B, Qadar Pasha MA. Genetic polymorphisms of GSTP1 and mEPHX correlate with oxidative stress markers and lung function in COPD. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;359(1):136-42.
- Vikman P, Xu CB, Edvinsson L. Lipid-soluble cigarette smoking particles induce expression of inflammatory and extracellular-matrix-related genes in rat cerebral arteries. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5(1):333-41.
- Wang IM, Stepaniants S, Boie Y, Mortimer JR, Kennedy B, Elliott M, Hayashi S, Loy L, Coulter S, Cervino S, Harris J, Thornton M, Raubertas R, Roberts C, Hogg JC, Crackower M, O'Neill G, Paré PD. Gene expression profiling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(4):402-11.
- Watanabe J, Hayashi S, Kawajiri K. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5'-flanking region. *J Biochem.* 1994;116(2):321-6.
- Watanabe T, Imoto I, Kosugi Y, Fukuda Y, Mimura J, Fujii Y, Isaka K, Takayama M, Sato A, Inazawa J. Human arylhydrocarbon receptor repressor (AHRR) gene: genomic structure and analysis of polymorphism in endometriosis. *J Hum Genet.* 2001;46(6):342-6.

- Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*. 1998;19(2):275-80.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):3195-9.
- Wood AM, Stockley RA. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2006;7:130.
- Yanchina ED, Ivchik TV, Shvarts EI, Kokosov AN, Khodzhayantz NE. Gene-gene interactions between glutathione-s transferase M1 and matrix metalloproteinase 9 in the formation of hereditary predisposition to chronic obstructive pulmonary disease. *Bull Exp Biol Med*. 2004;137(1):64-6.
- Yang IA, Fong KM, Zimmerman PV, Holgate ST, Holloway JW. Genetic susceptibility to the respiratory effects of air pollution. *Thorax*. 2008;63(6):555-63.
- Yang P, Sun Z, Krowka MJ, Aubry MC, Bamlet WR, Wampfler JA, Thibodeau SN, Katzmann JA, Allen MS, Midthun DE, Marks RS, de Andrade M. Alpha1-antitrypsin deficiency carriers, tobacco smoke, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer risk. *Arch Intern Med*. 2008;168(10):1097-103.
- Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol*. 2000;19(7):623-9.
- Yim JJ, Park GY, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, Yoo CG. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Koreans: combined analysis of polymorphic genotypes for microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1 and T1. *Thorax*. 2000;55(2):121-5.
- Yoshikawa M, Hiyama K, Ishioka S, Maeda H, Maeda A, Yamakido M. Microsomal epoxide hydrolase genotypes and chronic obstructive pulmonary disease in Japanese. *Int J Mol Med*. 2000;5(1):49-53.
- Young RP, Hopkins R, Black PN, Eddy C, Wu L, Gamble GD, Mills GD, Garrett JE, Eaton TE, Rees MI. Functional variants of antioxidant genes in smokers with COPD and in those with normal lung function. *Thorax*. 2006;61(5):394-9.
- Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99(14):1788-94.

Literatura

Zhu G, Warren L, Aponte J, Gulsvik A, Bakke P, Anderson WH, Lomas DA, Silverman EK, Pillai SG; International COPD Genetics Network (ICGN) Investigators. The SERPINE2 gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease in two large populations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(2):167-73.

Zidzik J, Slabá E, Joppa P, Kluchová Z, Dorková Z, Skyba P, Habalová V, Salagovic J, Tkáčová R. Glutathione S-transferase and microsomal epoxide hydrolase gene polymorphisms and risk of chronic obstructive pulmonary disease in Slovak population. *Croat Med J.* 2008;49(2):182-91.

Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration.* 2000;67(2):117-33.

