

# Polimorfizam gena NQO1 i NBS1 kao čimbenici rizika zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva

---

**Lozić, Bernarda**

**Scientific master's theses / Magistarski rad**

**2009**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:704039>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-03**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**Sveučilište u Splitu**  
**Medicinski fakultet**

**Bernarda Lozić**

**POLIMORFIZAM GENA NQO1 i NBS1 KAO  
ČIMBENICI RIZIKA ZLOĆUDNIH BOLESTI  
KRVOTVORNOG TKIVA**

**Magistarski rad**

**Split, 2009.**

**Rad je izrađen u:**

**1. Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu**

**1.1. Zavodu za molekularnu biologiju**

**2. Kliničkom bolničkom centru Split**

**2.1. Klinici za dječje bolest**

**2.1.1. Laboratoriju za medicinsku genetiku**

**2.2. Klinici za unutarnje bolesti**

**Voditelj rada : doc.dr.sc. Danka Grčević**

**Posebnu zahvalnost dugujem mentorici doc.dr.sc. Danki Grčević na potpori u zajedničkom znanstveno-istraživačkom radu.**

**Zahvaljujem prof.dr.sc. Tatijani Zemunik pri izvođenju i konačnoj realizaciji ovog rada.**

**Iskreno zahvaljujem i osoblju Laboratorija za medicinsku genetiku KBC Split koji su mi pomogli u dobivanju i pripremi uzoraka za istraživanje.**

**Hvala kćerki Mireli na razumjevanju i potpori.**

# SADRŽAJ

|  | stranica |
|--|----------|
| 1. UVOD.....   | 1        |
| 1.1. Zloćudne bolesti krvotvornog tkiva i podjela prema prognostičkim pokazateljima..... | 1        |
| 1.1.1. Zloćudne bolesti mijeloidne loze.....   | 2        |
| 1.1.2. Zloćudne bolesti limfoidne loze.....  | 5        |
| 1.2. Patofiziološki procesi nastanka zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva.....            | 6        |
| 1.2.1. Nastanak kromosomskih aberacija.....  | 7        |
| 1.2.2. Genetika somatskih stanica .....  | 8        |
| 1.2.3. Individualni metabolizam karcinogena.....   | 9        |
| 1.2.4. Čimbenici rizika u leukemogenezi .....  | 11       |
| 1.3. Uloga gena NQO1 i NBS1 u nastanku zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva .....         | 11       |
| 1.3.1. NAD(P)H: kvinon oksidoreduktaza .....   | 11       |
| 1.3.1.1. Odgovor na oksidativni stres .....  | 16       |
| 1.3.2. Sindrom loma Nijmegen .....   | 17       |
| 1.3.2.1. Heterozigotnost 657del5 i povećani rizik za zloćudnu bolest.....                | 21       |
| 1.3.2.2. Mogući utjecaj mutacije gena NBS1 u patogenezi akutnih leukemija.....           | 22       |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....   | 24       |
| 3. ISPITANICI I METODE RADA.....   | 25       |
| 3.1. Ispitanici.....   | 25       |
| 3.2. Citogenetska analiza koštane srži.....  | 26       |
| 3.3. Molekularne metode i interpretacija nalaza.....                                     | 27       |
| 3.3.1. Izdvajanje deoksiribonukleinske kiseline .....                                    | 27       |
| 3.3.2. Polimerazna lančana reakcija i određivanje polimorfizma analizom                  |          |

|  |    |
|--|----|
| duljine restrikcijskih ulomaka za gen NQO1.....  | 29 |
| 3.3.3. Polimerazna lančana reakcija za određivanje delecije<br>mutacije 657del5 gena NBS1..... | 32 |
| 3.4. Statistička analiza podataka.....   | 34 |
| 4. REZULTATI RADA .....  | 35 |
| 5. RASPRAVA.....   | 46 |
| 6. ZAKLJUČCI.....  | 53 |
| 7. SAŽETAK.....  | 55 |
| 8. SUMMARY.....  | 57 |
| 9. LITERATURA.....   | 60 |
| 10. ŽIVOTOPIS.....   | 70 |

## **Popis kratica**

|         |   |
|---------|---|
| ALL     | akutna limfoblastična leukemija                       |
| AML     | akutna mijeloična leukemija                           |
| CA      | kromosomska aberacija                                 |
| CGH     | komparativna genomska hibridizacija                   |
| CML     | kronična mijeloična leukemija                         |
| CYP2DE1 | citokrom 2DE1   |
| DNA     | deoksiribonukleinska kiselina                         |
| DSB     | lom dvolančane DNA                                    |
| FISH    | fluoroscencijska in situ hibridizacija                |
| GTG     | Giemsa Tripsin Giemsa                                 |
| HR      | homologna rekombinacija                               |
| inv(16) | inverzija kromosoma 16                                |
| ISCN    | Međunarodni sustav citogenetske nomenklature          |
| MDS     | sindrom mijelodislazije                               |
| MLL     | mijeloidno/limfoidni onkogen kod leukemije            |
| MPO     | mijeloperoksidaza                                     |
| MRD     | minimalna ostatna bolest                              |
| MRN     | kompleks staničnih proteina, regulatori DNA oštećenja |
| NAD     | nikotin-adenin-dinukleotid                            |
| NAD(P)H | nikotin-adenin-dinukleotid (fosfat) hidroksi          |
| NBS     | sindrom loma Nijmegen                                 |

|            |   |
|------------|---|
| NBS1 (NBN) | gen sindroma loma Nijmegen                        |
| NHEJ       | nehomologno spajanje krajeva                      |
| NQO1       | kvinon oksidoreduktaza 1                          |
| PCR        | lančana reakcija polimeraze                       |
| PRV        | policitemija rubra vera                           |
| p53        | antionkogen (naziv)                               |
| p95/NBS1   | nibrin  |
| RFLP       | polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka       |
| RNA        | ribonukleinska kiselina                           |
| SKY        | spektralna kariotipizacija                        |
| SSA        | jednolančano spajanje                             |
| t-AM       | terapijom posredovana akutna mijeloična leukemija |
| WHO        | Svjetska zdravstvena organizacija                 |

# 1. UVOD

## 1.1. Zloćudne bolesti krvotvornog tkiva i podjela prema prognostičkim pokazateljima

Leukemije i limfomi najčešće su zloćudne bolesti mijelopoetičkog i limfopoetičkog tkiva. Podjela zloćudnih bolesti krvotvornog sustava polazi od prijedloga stručne skupine Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation* - WHO) koja bolesti dijeli po zahvaćenosti pojedinih krvotvornih loza i stanica te po specifičnom tijeku i prognozi bolesti. Zloćudne bolesti krvotvornog sustava dijele se na zloćudne bolesti mijeloidne loze, limfoidne loze, mastocita, histiocita i dendritičnih stanica, te limfoproliferativne bolesti nakon presađivanja tkiva i organa. U suvremenu podjelu uključene su i genetske promjene koje se određuju citogenetskim i molekularno-biološkim postupcima, čiji su rezultati značajni u prognozi bolesti. Ova podjela nastoji povezati genetske promjene i kliničku sliku s morfoloijom, citokemijom i imunofenotipizacijom. S praktičkog kliničkog stajališta najvažnije je razlikovati zloćudne bolesti mijeloidne i limfoidne loze (1). S obzirom na kliničku sliku i raspodjelu tumorske mase, zloćudne bolesti krvotvornog sustava dijele se na leukemije i limfome. Leukemija je sindrom koji obuhvaća skupinu klonskih zloćudnih promjena krvotvornih matičnih stanica. Osnovna je klinička značajka leukemije nakupljanje leukemijskih stanica u koštanoj srži i njihova pojava u perifernoj krvi. Limfomi se očituju povećanjem limfnih čvorova i slezene, a nastaju zbog infiltracije zloćudnim stanicama (1,2).



### 1.1.1. Zloćudne bolesti mijeloidne loze

Zloćudne bolesti mijeloidne loze definiraju se kao maligne bolesti stanica mijelopoeze. Podjela nastoji povezati genetske promjene i kliničku sliku s morfoloijom, citokemijom i imunofenotipizacijom i predlaže četiri glavne skupine mijeloidnih zloćudnih bolesti (1):

1. mijeloproliferativne bolesti,
2. mijeloproliferativne bolesti sa znacima mijelodislazije,
3. sindrom mijelodislazije,
4. akutne mijeloične leukemije.

1. **Mijeloproliferativne bolesti** su klonalne bolesti krvotvornih matičnih stanica koje karakterizira pojačana hematopoeza i zato povećani broj krvnih stanica u periferiji, bilo jedne ili više mijeloidnih loza, uz hepatosplenomegaliju (tablica 1) (3).

*Tablica 1. Podjela mijeloproliferativnih bolesti*

---

*Kronična mijeloična leukemija, Ph<sup>+</sup> (t(9;22)(q34,q31), BCR/ABL), Filadelfija pozitivna (CML)*

*Kronična granulocitna leukemija*

*Kronična eozinofilna leukemija/hipereozinofilni sindrom*

*Kronična idiopatska mijelofibroza*

*Policitemija rubra vera (PRV)*

*Esencijalna trombocitemija*

*Mijeloproliferativna bolest (neklasificirana)*

---

2. **Mijeloproliferativne bolesti sa znacima mijelodislazije** uključuju bolesti koje istodobno pokazuju znakove mijeloproliferacije i morfološke značajke

mijelodisplazije. Tu spadaju juvenilna i kronična mijelomonocitna bolest (tablica 2) (3).

*Tablica 2. Podjela mijeloproliferativnih bolesti sa znacima mijelodisplazije*

---

|   |
|---|
| <i>Kronična mijelomonocitna leukemija</i>     |
| <i>Atipična kronična mijeloična leukemija</i> |
| <i>Juvenilna mijelomonocitna leukemija</i>    |

---

**3. Sindrom mijelodisplazije** (engl. *myelodysplastic syndrom* - MDS) klonalna je bolest matičnih krvotvornih stanica koja se očituje nedjelotvornom hematopoezom i zbog toga citopenijom, uz različiti stupanj hipercelularnosti u koštanoj srži. Bolesnici obično pokazuju slabi odgovor na liječenje i imaju povećani rizik od prijelaza bolesti u akutnu leukemiju (tablica 3) (3).

*Tablica 3. Podjela mijelodisplazija\**

---

|   |
|---|
| <i>Refraktorna anemija</i>  |
| <i>s prstenastim sideroplastima (RARS)</i>                        |
| <i>bez prstenastih sideroplasta (RA)</i>                          |
| <i>Refraktorna citopenija s displazijom više krvotvornih loza</i> |
| <i>Refraktorna anemija sa suviškom blasta (RAEB)</i>              |
| <i>5q- sindrom</i>  |
| <i>Mijelodisplastički sindrom (neklasificirani)</i>               |

---

\* refraktorna anemija s prstenastim sideroplastima (engl. *refractory anemia with ringed sideroblasts* - RARS), refraktorna anemija bez prstenastih sideroplasta (engl. *refractory anemia* - RA), refraktorna anemija sa suviškom blasta (engl. *refractory anemia with excess blasts* - RAEB), 5q- (*delecija dugog - q kraka kromosoma 5*)

**4. Akutne mijeloične leukemije** (engl. *acute myeloic leukemia* - AML) moraju sadržavati leukemijsku masu od 20% ili više blasta u koštanoj srži prema definiciji WHO. Prema podjeli WHO razlikujemo četiri skupine akutnih mijeloičnih leukemija (tablica 4) (4).

*Tablica 4. Podjela akutnih mijeloičnih leukemija*

---

|  |
|--|
| <i>AML s citogenetskim translokacijama</i> |
| <i>AML sa znacima mijelodisplazije</i>     |
| <i>AML i MDS nakon terapije</i>            |
| <i>Ostale AML</i>                          |

---

AML s citogenetskim translokacijama imaju dobru prognozu pa se liječe intenzivnom kemoterapijom. Kod ponovne pojave bolesti predlaže se liječenje alogeničnom ili autolognom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica. Druga podskupina AML, koja nastaje iz prethodnog MDS, ima lošu prognozu. Pretpostavlja se da su sve ove bolesti posljedica sličnoga genskog oštećenja, izazvanog okolišem ili jatrogeno. Sekundarne AML (treća podskupina ovih leukemija) obično su posljedica kemoterapije. Ta skupina AML ima nepovoljnu prognozu zbog prisutnosti displazije u više hematopoetskih loza u vrijeme dijagnoze te prethodne terapije alkilirajućim tvarima (1,4).

### 1.1.2. Zloćudne bolesti limfoidne loze

Limfoproliferativne bolesti su zloćudne preobrazbe stanica limfopoeze. Akutna limfoblastična leukemija (engl. *acute lymphoblastic leukemia* - ALL) limfoproliferativna je bolest krvotvornih matičnih stanica T- i B-loze. Podjela ALL polazi od citomorfološkog dokaza zahvaćenosti limfoidne loze (postojanje limfoblasta). Zbog jednostavnosti i brzine, a radi potvrde dijagnoze, uvijek valja napraviti i citokemijsku analizu koja će obično potvrditi zahvaćenost limfoidne loze. Potom slijedi obvezatna rutinska citogenetska, imunološka i molekularno-genetska analiza. Podjela ALL prema prognostičkim citogenetskim promjenama navedena je u tablici (tablici 5) (1,5).

*Tablica 5. Podjela akutnih limfoblastičnih leukemija\**

---

*Prekursorske B-stanične ALL (citogenetske podskupine)*

- *t(9;22)(q34;q11); BCR/ABL*
- *t(v;11q23); preustroj MLL*
- *t(1;19)(q23;p13); E2A/PBX1*
- *t(12;21)(p12;q22); ETV/CBF-alpha*

*Prekursorske T-stanične ALL*

*Akutna leukemija Burkittovih stanica*

---

\* t - translokacija, p - kratki krak kromosoma, q - dugi krak kromosoma, prva zagrada iza t - kromosomi uključeni u translokaciju, a druga zagrada - točke loma tih kromosoma. Nakon toga slijede imena aktiviranih onkogeni nastalih kao posljedica određenih translokacija: BCR (engl. *breakpoint cluster region*), ABL (engl. *Abelson murine leukemia*), MLL (engl. *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia*), E2A (engl. *immunoglobulin enhancer binding factors E12/E*), PBX1 (engl. *pre-B-cell leukemia homeobox 1*), ETV (engl. *ets variant gene*) i CBFA2 (engl. *core binding factor A2*).

## 1.2. Patofiziološki procesi nastanka zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva

Krvotvorne zloćudne bolesti su klonalne bolesti koje nastaju zbog genetske promjene u jednoj krvotvornoj stanici u koštanoj srži ili limfnom tkivu (6). Takva promijenjena stanica dijeli se, oblikujući patološki klon stanica, a dokaz klonalnosti se određuje citogenetskim nalazom istih ili iste promjene u tri metafaze (7). U tumorskoj patogenezi pojavljuje se niz uzastopnih genetskih promjena, pri čemu svaka od promjena omogućuje poremećenom klonu stanica prednost u rastu. Promijenjena populacija stanica umnožava se i dominira, a krajnji rezultat su stanice koje sadrže specifične genetske promjene i fenotipski se očituju malignom bolešću. Poznato je da mutacija određenih gena tzv. protonkogeni uzrokuje neprimjereni i nesvršishodni rast nastalog klona stanica, što je temeljna značajka zloćudnog tumorskog rasta. Uz to, mutacijom tumorsupresorskog gena, nastali klon stanica nema kontroliranu programiranu smrt (apoptozu) koja odstranjuje promijenjene stanice, pa sve tumorske stanice preživljavaju i pokazuju prednost u rastu u usporedbi sa zdravim stanicama. Vjeruje se da genetske promjene treće skupine gena - geni popravka deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid* - DNA) krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair genes*) imaju neposredni utjecaj na preživljavanje i proliferaciju stanica (8).

Mehanizam nastanka klonalne promjene malo je poznat, ali sigurno mu je osnova u bazičnim promjenama DNA, koje prenose zloćudne značajke u transformirane stanice i potomke (7). Brojni biokemijski i genetski mehanizmi doprinose podložnosti zloćudnoj preobrazbi i mogu se svrstati u široke kategorije (10,11):

1. stanični rast i diferencijacija,

2. popravak i replikacija DNA,
3. metabolizam karcinogena,
4. apoptoza,
5. odgovor na oksidativni stres,
6. stanični ciklus.

### **1.2.1. Nastanak kromosomskih aberacija**

Promjene broja ili strukture kromosoma nazivaju se kromosomske aberacije (engl. *chromosomal aberration – CA*). One su u čovjeka česta pojava a zapravo su mikroskopski vidljivi dijelovi patoloških DNA-promjena, akumuliranih različitim mehanizmima popravka loma dvolančane DNA (engl. *double strand breake - DSB*) (12). Genom eukariotskih stanica je pod stalnim utjecajem čimbenika iz okoliša, ultravioletnog svjetla, ionizirajućeg zračenja i reaktivnih molekula normalnog unutarstaničnog metabolizma (13). Eukariotski kromosomi sadržavaju jednu kontinuiranu molekulu DNA, koja se replicira za vrijeme S-faze (u presintetičkoj fazi staničnog ciklusa). Takva molekula DNA je iznimno duga, kada se uspoređuje s metafaznim kromosomima, i zbog toga podložna kemijskim i fizičkim oštećenjima različitog podrijetla. Jedno od najopasnijih oštećenja genoma je DSB (14). U stanicama eukariota, DSB se popravljiva s najmanje tri različita mehanizma:

1. popravak homologne rekombinacije (engl. *homologous recombination* - HR) – visokoprecizni proces koji obično uspostavlja originalnu sekvencu na lomu,
2. popravak jednolančanim spajanjem (engl. *single-strand annealing* - SSA) – koji poglavito ostavlja mjesto s intersticijalnom delecijom,
3. nehomologno spajanje krajeva (engl. *non-homologous end joining* - NHEJ) – koje pridružuje dva prekinuta kraja izravno i obično uzrokuje razmjerno male nepravilnosti (supstituciju parova baza, inserciju ili deleciju) na mjestu loma (15).

Homologna rekombinacija je popravak specifičan za stanice S-faze i G2-faze staničnog ciklusa, dok se nehomologno spajanje krajeva događa cijelo vrijeme staničnog ciklusa. Jednom proizveden DSB u stanici, ako nije uspješno ponovno prespojen, može uzrokovati staničnu smrt, ostaviti genetsku mutaciju, kromosomska preuređenja, onkogenu transformaciju i uzrokovati druge fenotipske stanične abnormalnosti koji su važni mehanizmi karcinogeneze (16).

### **1.2.2. Genetika somatskih stanica**

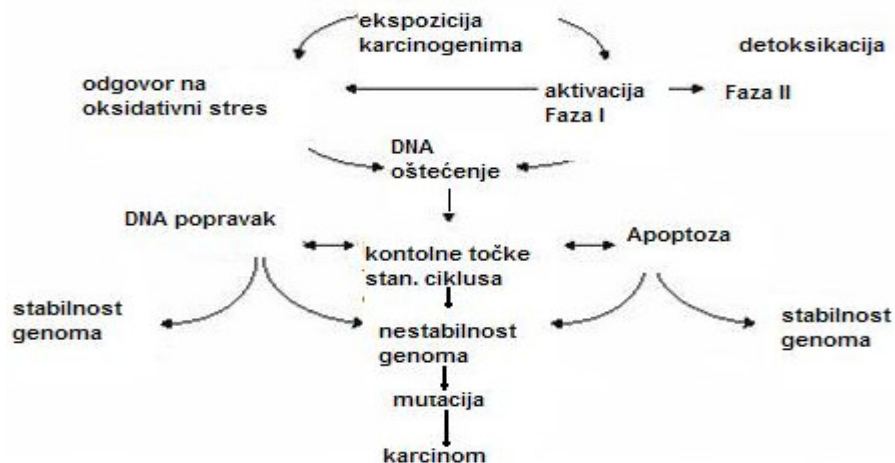
U somatskoj stanici može se proučavati slika patološke promjene povezane s kromosomskom topologijom, nuklearnom strukturom i genskom mapom. To se može postići različitim tehnikama standardne i molekularne citogenetike kao što su: fluorescencijska *in situ* hibridizacija (engl. *fluourosence in situ hybridisation* - FISH), spektralna kariotipizacija s 24 različite fluorescentne boje (engl. *spectral karyotyping*, SKY), komparativna genomska hibridizacija (engl. *comparative genomic hybridization* - CGH ) i polimerazna lančana reakcija (engl. *polymerase chain reaction* - PCR). Poznato je da su različite kromosomske aberacije povezane s različitim zloćudnim bolestima

hematopoetskog tkiva. Neke od njih koreliraju sa specifičnim sindromom i rabe se pri određivanju dijagnoze i terapijskog protokola, a druge imaju prognostički značaj pa omogućuju praćenje učinka terapije i detekcije minimalne ostatne bolesti (engl. *minimal residual disease* - MRD) (17).

### **1.2.3. Individualni metabolizam karcinogena**

Dosadašnje studije pokazale su da istraživanje jedne genotipske značajke (promjene) nije dovoljno za objašnjenje etiologije leukemija, posebno u djece, zbog kompleksnosti utjecaja čimbenika okoliša kao i individualne razlike u podložnosti zloćudnoj bolesti. Sporadične zloćudne bolesti, kao ALL, složene su bolesti u kojima se učinak niza gena „niske penetracije“ podešava vanjskim čimbenicima i tako formira individualni rizik za razvoj zloćudne bolesti. Unatoč mnogim nastojanjima, patogeneza ALL nije razjašnjena, a posebno se malo zna o genskoj predispoziciji. Leukemogeneza u djece može biti povezana s određenim slijedovima DNA, u nekim genima uključenim u još uvijek nedovoljno poznate puteve složenog (višestupanjskog) procesa karcinogeneze, a kombinacija genotipova može bolje predvidjeti rizik obolijevanja nego svaki od njih neovisno (slika 1) (10,18).





*Slika 1. Shematski prikaz različitih puteva karcinogeneze i njihove međusobne povezanosti.*

Kemijski karcinogeni nisu reaktivni kao takvi, oni zahtijevaju metaboličku aktivaciju prije interakcije s genetskim materijalom, a mogu ostaviti mutaciju, te eventualno potaknuti zloćudnu preobrazbu. Metabolička aktivacija događa se u prvoj fazi (Faza 1, slika 1) i to enzimima koji su uključeni u hidrolizu, redukciju i reakcije oksidacije. U drugoj fazi (Faza II, slika 1) enzimi neutraliziraju toksične supstancije aktivirane za vrijeme prve faze katalitičkim reakcijama kao što su glukuronidacija, sulfonizacija, acetilacija, metilacija i konjugacija s glutationom ili aminokiselinama. Nakon toga se aktivne supstancije pretvaraju u neaktivne, a vodotopivi produkti se izlučuju iz organizma putem urina ili žuči. Poznato je da se neki od ovih enzima nalaze u različitim oblicima, predstavljajući dobro definirane biokemijske fenotipove. Ti različiti fenotipovi imaju različite značajke: povećanu ili smanjenu aktivnost ili su potpuno bez enzimске aktivnosti, a njihove različitosti povezuju se s različitim slijedovima DNA

odgovarajućih gena. Izravan biokemijski učinak ovih oblika uzrokuje razlike u metabolizmu karcinogena među osobama (18).

#### **1.2.4. Čimbenici rizika u leukemogenezi**

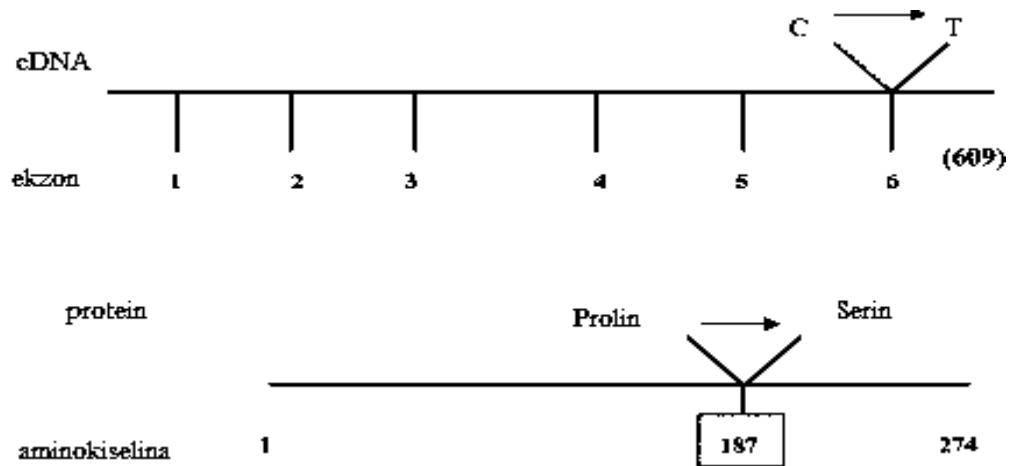
Čimbenike koji povećavaju vjerojatnost pojave neke bolesti nazivamo čimbenicima rizika. Brojni čimbenici djeluju leukemogeno: od gena do čimbenika okoliša poput zračenja, kemijskih sredstava ili bioloških uzročnika kao što su bakterije i virusi. Time se oštećuje proces popravka DNA što uzrokuje genomsku nestabilnost, a to podrazumijeva nastanak kromosomskih preuređenja, gubitak heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity* - LOH) i mutacije gena koje mogu uzokovati razvoj zloćudne bolesti (19).

### **1.3. Uloga gena NQO1 i NBS1 u nastanku zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva**

#### **1.3.1. NAD(P)H: kvinon oksidoreduktaza**

NAD(P)H: kvinon oksidoreduktaza (engl. *quinone oxidoreductase 1* - NQO1) je citosolni flavoenzim koji ima važnu ulogu u zaštiti stanice od endogenih i egzogenih kvinona i njihovih derivata (20). Katalitičko svojstvo NQO1 prvi su opisali Ernster i Navazio 1958. godine. NQO1 rabi kao redukcijski koenzim nikotin-adenin-dinukleotid-fosfat (NADP) ili nikotin-adenin-dinukleotid (NAD), koji prenose vodik i tako štiti

stanicu od nepoželjnog oksidativnog oštećenja (21). Ovaj enzim je potaknut oksidativnim stresom ili policikličnim aromatskim ugljikovodikom (benzen) koji je nastao sagorijevanjem dima cigareta, ispušnih plinova automobila i dr. Potiču ga i endogeno proizvedeni kvinoni kao što su metaboliti vitamina K i dr. (22-24). Enzim je kodiran genom NQO1 koji se nalazi na kromosomu 16q22 (21), duljine oko 17 kb (kilobaza) i ima šest egzona. Polimorfizam gena C609T (NQO1\*2) očituje se supstytucijom nukleotida citozina (C) s timidinom (T) (C→T) u kodonu 609 DNA na šestom ekzonu (C609T), mjenjajući kodon 187 u serin umjesto prolina (P187S) što destabilizira i inaktivira enzim (slika 2) (25).

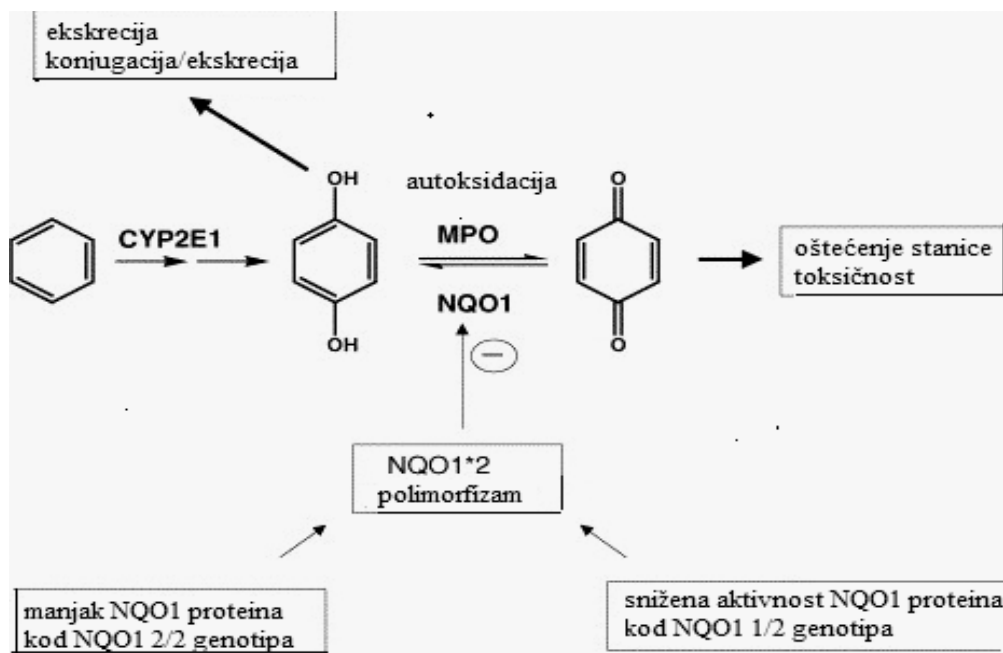


Slika 2. Gen NQO1 i lokalizacija polimorfizma C609T te posljedična promjena u proteinu.

Nositelji polimorfizma na oba alela (NQO1 2/2 ili T/T ) ne proizvode enzim, dok ga heterozigoti (NQO1 1/2 ili C/T ) proizvode polovično u usporedbi sa zdravim homozigotima (NQO1 1/1 ili C/C ) za taj gen (26,27). Učestalost homozigotnog oblika

mutacije (NQO1 2/2 ili T/T ) genotipa varira u različitim etničkim skupinama, a iznosi 4% u bijelaca, 5% u Afroamerikanaca, 16% u meksičkih Hispanaca i 22% u kineskoj populaciji (28).

Enzimska aktivnost NQO1 povezuje se s detoksikacijom brojnih spojeva. Nedostatak enzimske aktivnosti može povećati rizik razvoja nekih toksičnih oštećenja i zloćudnih bolesti. Razmjerno novi podaci ukazuju da normalna aktivnost NQO1 može zaštititi pojedince od toksičnog oštećenja krvotvornih matičnih stanica benzenom. Toksično oštećenje benzenom u koštanoj srži uzrokuje različite oblike bolesti krvnih stanica (27). Tako benzen i njegovi metaboliti u koštanoj srži uzrokuju progresivnu leukopeniju, anemiju, trombocitopeniju i čak pancitopeniju. Toksični učinak benzena započinje s proizvodnjom fenola u jetri posredovanjem citokroma 2DE1 (engl. *cytochrome* - CYP2DE1). Benzenski mono-, di- i tri-hidroksni spojevi prenose se u koštanu srž gdje mijeloperoksidaza pretvara fenole u nekoliko kvinona, koji su iznimno toksični. Mijeloperoksidaza je lizosomalni enzim jako izražen u koštanoj srži. Aktivira se karcinogenima iz dima cigareta, kao što su benzo-/benza-pireni i aromatski amini, procesima organskog otapanja visokoreaktivnih međuprodukata i pridonosi oksidativnom stresu oslobađajući slobodne radikale (29). Enzim NQO1 ima zaštitnu ulogu, jer štetne benzokvinone pretvara u manje toksične hidroksi-metabolite koji se izlučuju urinom iz organizma. Stoga visoke vrijednosti jetrenog enzima CYP2E1 i mijeloperoksidaze, a niske vrijednosti enzima NQO1 u određenih osoba, povećavaju rizik za hematotoksično djelovanje kemijskih karcinogena (slika 3) (30).



Slika 3. Shema uloge citokroma CYP2E1, mijeloperoksidaze i enzima NQO1 u metabolizmu benzena i mogući učinak polimorfizma gena NQO1\*2, koji uzrokuje sniženje aktivnosti ili gubitak aktivnosti enzima NQO1.

Imunohistokemijske analize koštane srži nakon biopsije kosti pokazale su izražaj enzima NQO1 u endotelnim stanicama i adipocitima (31). Endotelne stanice strome koštane srži pridonose sazrijevanju krvotvornih matičnih stanica, a poznato je da su uključene u staničnu adheziju, proliferaciju, diferencijaciju i kontrolu migracije matičnih stanica kroz endotelnu staničnu barijeru (32). Uz to, endotelne stanice ljudske koštane srži mijenjaju obrazac lučenja citokina nakon izlaganja benzenskim metabolitima. Ta funkcija endotelnih stanica, nakon izlaganja benzenu, oštećena je u osoba s polimorfizmom C609T. Dakle, enzim NQO1 u stromi koštane srži, posebno u endotelnim stanicama velikih krvnih žila i sinusoida strome, ima protektivnu ulogu u leukemogenezi. Drugi mogući zaštitni mehanizam posredovan enzimom NQO1 je stabilizacija bjelančevine p53 (33).

U osoba s polimorfnim alelom nedostatak ili snižena aktivnost enzima NQO1 u endotelnim stanicama uzrokuje povećanu osjetljivost krvotvornih matičnih stanica prema kemijskim oštećanjima i moguću povezanost s razvojem leukemija. Nekoliko epidemioloških studija je do sada povezal polimorfizam C609T gena NQO1 s povećanim rizikom razvoja različitih oblika leukemija.

Smith i suradnici, u svojoj su studiji pokazali povećanu učestalost AML nakon izlaganja benzenu i drugim karcinogenima u osoba s genotipskim varijantama gena NQO1. U svojoj drugoj studiji, provedenoj u Velikoj Britaniji, isto tako dokazuje povezanost polimorfizma C609T gena NQO1 s *de novo* nastalim leukemijama u odraslih osoba, a dokazuje i veću učestalost ovog polimorfizam u bolesnika s populacijskom varijantom i to pericentričnom inverzijom kromosoma 16 i inverzijom kromosoma 16 inv(16) (34,35). Larson i suradnici u SAD-u, isto kao Naoe i suradnici u Japanu, svojim studijama su povezali homozigotnost polimorfnih alela s povećanim rizikom obolijevanja od akutne mijeloične leukemije/mijelodisplazije nastale nakon primanja kemoterapije (t-AML/MDS) (36,37). Wiemels i Smith sa suradnicima povezuju polimorfizam C609T gena NQO1 s leukemijama dječje dobi posebno onih s onkogenim MLL (eng. *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia*) preuređenjem i to u svojoj studiji provedenoj na uzorku populacije Velike Britanije (38,39). Krajinovic i suradnici isto potvrđuju povezanost spomenutog polimorfizma s akutnim limfoblastičnim leukemijama dječje dobi u Kanadi i to na uzorku populacije bijelaca francuskog podrijetla (40).

Nekoliko studija nije pronašlo povezanost polimorfizma C609T gena NQO1 gena s *de novo* akutnim leukemijama, s terapijom posredovanim leukemijama, kao ni s

leukemijama dječje dobi. Ispitivanja provedena u populaciji Turske, koja su napravili Sirma i suradnici opovrgavaju povezanost ispitivanog polimorfizma s akutnim leukemijama dječje dobi (41). U populaciji Velike Britanije, Seedhouse i suradnici ispitivali su povezanost polimorfizma nekoliko gena uključenih u popravak molekule DNA s funkcionalnim polimorfizmom NQO1 u bolesnika s AML i nisu našli povezanost (42). Blanco i suradnici u svojoj studiji u SAD-u, u kojoj su podjednako bili zastupljeni bijelci, crnci i Hispanci, nisu pronašli povezanost polimorfizma C609T gena NQO1 s t-AML u djece liječene zbog ALL (43).

#### **1.3.1.1. Odgovor na oksidativni stres**

NQO1 je citosolni enzim koji katalizira redukciju dva elektrona od kvinona i prevenira njihovo učešće u redoks-ciklusu i u oksidativnom stresu (44). Uloga NQO1 kao protuoksidacijskog enzima potkrijepljena je populacijskim studijama koje su imunohistokemijskim postupcima pokazale da se enzim NQO1 nalazi u mnogim tkivima kojima je potreban visoki stupanj antioksidacijske zaštite. To su epitelne stanice pluća, dojke i debelog crijeva, vaskularni endotel, adipociti, epitel korne i leće, pigmentirani epitel mrežnice, optičkog živca i živčanih vlakana. NQO1 je snažno izražen u mnogim solidnim tumorima (pluća, kolona i dojke) i jedan je od mogućih kandidata za razvoj novih lijekova usmjerenih na mijenjanje aktivnosti enzima (45). NQO1 ima ulogu detoksicirajućeg enzima u metabolizmu mnogih lijekova koji proizvode alkilirajuće metabolite, a koji imaju mutageno djelovanje. Ti spojevi alkiliraju atome dušika u purinima i spajaju gvanine suprotnih lanaca DNA, zbog toga DNA postaje nestabilna i metabolički neaktivna (46). Enzim katalizira redukciju kvinona, kvinonskih amina i nitro

spojeva koji se prekomjerno proizvode nakon kemoterapije. Mitomicin C je za sada jedini kvinon često korišten za kemoterapiju. On je citostatski antibiotik koji se umeće između lanaca DNA i tako koči djelovanje DNA-polimeraze. Postoje izvještaji koji pokazuju značajnu razliku u preživljavanju bolesnika liječenih mitomicinom C, ovisno o genotipu NQO1. Bolji odgovor na mitomicin C imali su bolesnici s diseminiranim peritonealnim karcinomom koji su imali normalni genotip NQO1 1/1 (47).

### **1.3.2. Sindrom loma Nijmegen**

Sindrom loma Nijmegen (MIM 251260) (engl. *Nijmegen breakage syndrome* - NBS) rijetka je autosomno-recesivna genetska bolest koja pripada grupi poremećaja nazvanih sindromima kromosomske nestabilnosti. Uglavnom se pojavljuju u Srednjoj i Istočnoj Europi. Bolesnici oboljeli od sindroma NBS imaju karakteristične simptome: mikrocefaliju, zastoj u rastu, osjetljivost na X-iradijacijsko zračenje, imunodeficijenciju i povećani rizik za razvoj maligne bolesti (48). Među bolesnicima koji boluju od sindroma NBS čest je razvoj limforetikularnih zloćudnih bolesti, hepatoma, malignog meningeoma, gonadoblastoma, meduloblastoma i rabdomiosarkoma u ranom djetinjstvu (49). Stanice bolesnika koji boluju od sindroma NBS pokazuju pojačanu osjetljivost na ionizirajuće zračenje, sniženu aktivnost homologne rekombinacije, ubrzano skraćivanje telomera i poremećaj kontrolnih točki staničnog ciklusa (faze G1, G2 i S) poslije ozračenja (50-52). Sindrom je uzrokovan mutacijama u genu NBS1 koji se nalazi na osmom kromosomu (8q21), a dokazan je postupkom analize povezanosti u obiteljima bolesnika i kasnije potvrđen pozicijskim kloniranjem (53). Novi preporučeni simbol za ovaj gen je NBN



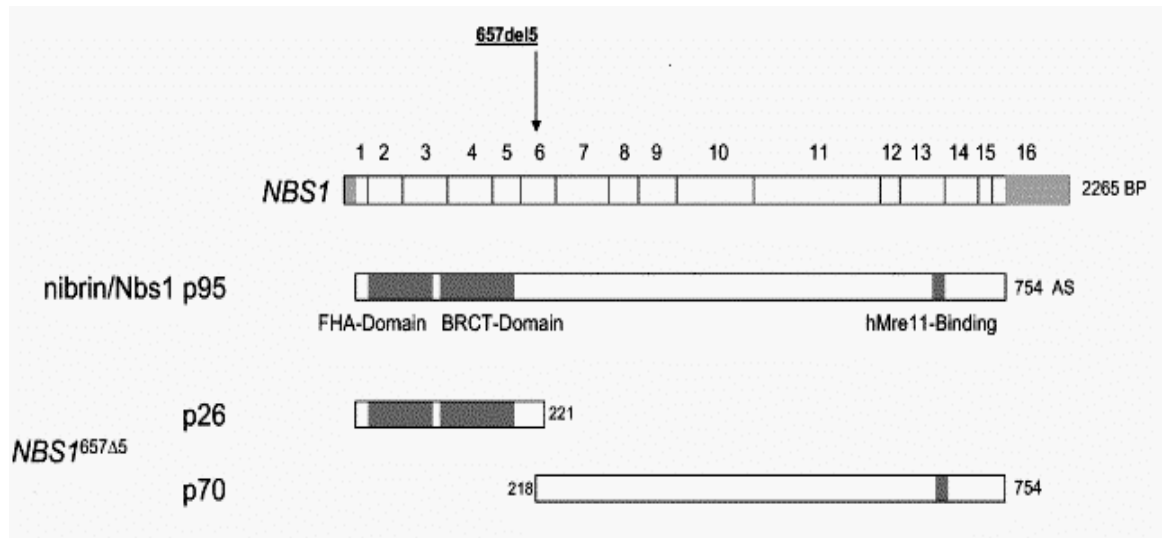
(engl. *Nijmegen breakage nibrin* - NBN), ali u daljnjem tekstu zadržat će se i dalje stari simbol NBS1 (54).

Preko 90% svih bolesnika su homozigoti za deleciju pet parova baza (657del5) u egzonu šest gena NBS1, a mutacija je pronađena u naroda slavenskog podrijetla, poglavito Istočne Europe pa je nazvana Slavenska mutacija (55,56). Učestalost mutacije 657del5 varira od niske 0,2% do najveće 1% u različitim slavenskim populacijama (57).

Gen NBS1 ima 16 egzona, a njegov proteinski produkt naziva se nibrin (engl. *nibrin/Nbs1* ili *p95*). U bolesnika s najučestalijom mutacijom 657del5 nema sinteze nibrina, nego se sintetiziraju proteinski fragmenti p26 i p70 (slika 4) (57). Nibrin, koji predstavlja protein p95, komponenta je staničnog kompleksa MRE11/RAD50/nibrin (kompleks MRN), koji ima važnu ulogu u staničnom odgovoru na oštećenje DNA i održavanje kromosomskog integriteta. Ljudski produkt gena NBS1 je protein koji sadrži 754 aminokiseline u tri funkcionalna dijela: N-kraj (aminokiseline od 1-183), središnji dio (aminokiseline 278-693) i C-kraj (aminokiseline 665-693) (58). Dva funkcionalna dijela, N-kraj i C-kraj, evolucijski su očuvana.

Ovi dijelovi gena mogu se opisati na sljedeći način:

1. N-kraj sastoji se od dva dijela nazvana FHA (engl. *fork head associated*) i BRCT (engl. *breast cancer COOH-terminal domain*) i uključen je u popravak loma dvolančane DNA i regulaciju kontrolnih točaka staničnog ciklusa.
2. C-kraj gena NBS1 veže proteinski produkt s kompleksom MRE11/RAD50 (slika 4) (57).

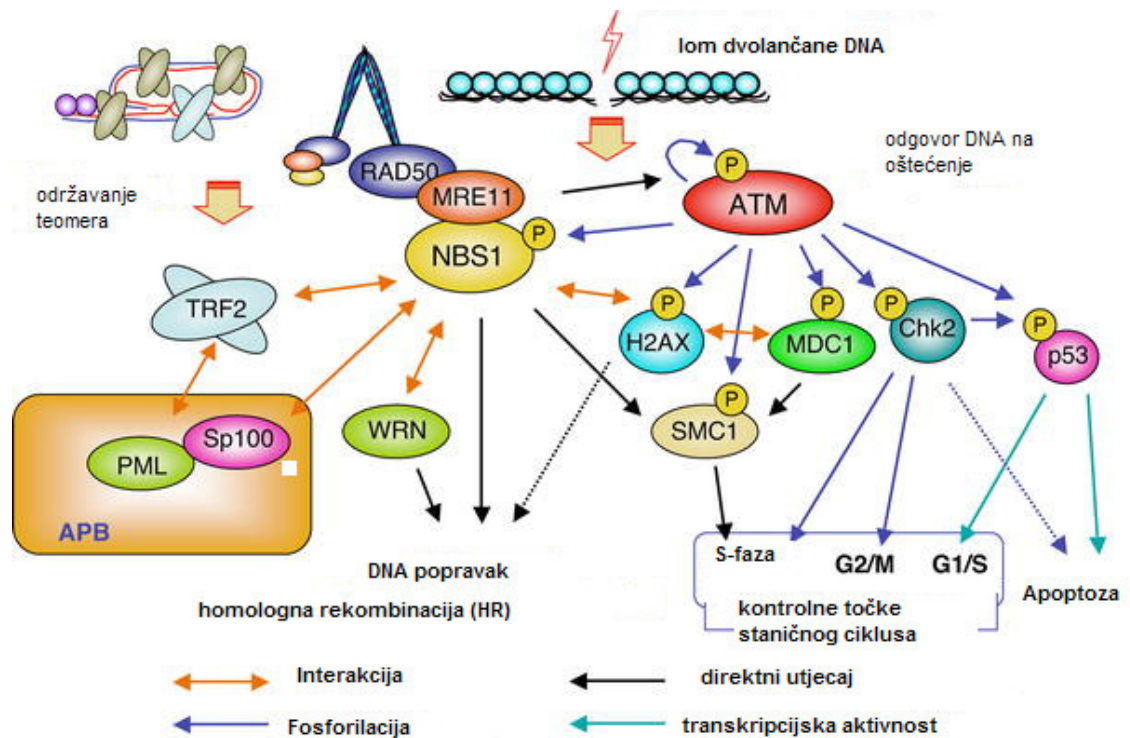


*Slika 4. Shematski prikaz gena NBS1 i delecijske mutacije 657del5 te njihovih proteinskih proizvoda: normalni proteinski produkt nibrin/Nbs1 – p95 i proteinski produkti mutacije 657del5 – p26 i p70.*

NBS1 je glavni regulator kontrolne točke staničnog ciklusa S-faze, ali moguće je da je uključen i u kontrolne točke G1- i G2-faze staničnog ciklusa. Nibrin u kompleksu MRN ima ulogu da detektira oštećenje DNA, prenese signal unutar stanice i pokrene mehanizme popravka DNA te time očuva cjelovitost stanične DNA i genomsku stabilnost.

Lomovi dvolančane DNA vrlo često su izazvani ionizacijskim zračenjem, a takva oštećenja pripadaju u najopasnije vrste oštećenja DNA. Za prespajanje lomova DSB, kompleks u koji je uključen nibrin koristi dva načina: homolognu rekombinaciju i nehomologno spajanje krajeva, s tim da je nibrin važniji u obliku popravaka homolognom rekombinacijom (59). Gen NBS1 ima ulogu i u održavanju telomera, jer stanice bolesnika koji boluju od sindroma NBS pokazuju ubrzano skraćivanje telomera za vrijeme diobe. Putem nekih posrednika može potaknuti i apoptozu (52). Mutacije u genu

NBS1 narušavaju funkciju kompleksa MRN te se posljedično narušava cjelovitost stanične DNA i nastaje genomska nestabilnost. Zbog poremećaja u održavanju genomske stabilnosti može nastati zloćudna preobrazba. Dakle, nibrin kao dio kompleksa MRN sudjeluje u regulaciji održavanja cjelovitosti DNA djelovanjem na mehanizam popravaka lomova dvolančanih krajeva DNA i lomova DNA u telomerama (slika 5). Strelice na slici pokazuju aktivnost i različitih drugih proteina u prijenosu signala koji nastaje nakon pojave lomova dvolančanih krajeva DNA (57).



Slika 5. Putevi regulacije održavanja genomske stabilnosti u kojima sudjeluje gen *NBS1*.

### **1.3.2.1. Heterozigotnost 657del5 i povećan rizik za zloćudnu bolest**

Prije osamnaest godina prva istraživanja pokazala su da heterozigoti za mutaciju 657del5 imaju povećani rizik za razvoj zloćudne bolesti (60). Istraživanja naroda slavenskog podrijetla u Poljskoj, Češkoj i Ukrajini pokazala su visoku prevalenciju heterozigota za mutaciju 657del5 (1/177) (56). Ta mutacija mogla bi biti jedan od čimbenika rizika razvoja nekih zloćudnih bolesti u tim zemljama. Istraživanja u središnjoj Poljskoj pokazala su da NBS1-konstitucijski heterozigoti s mutacijom 657del5 imaju povećani rizik oboljenja od nekih zloćudnih bolesti i to melanoma, karcinoma dojke, kolorektalnog karcinoma i non-Hodgkinovog limfoma. Moguće je da oboljeli pokazuju i specifičnu senzitivnost pri terapiji s ionizantnim zračenjem ili citostatskim lijekovima (61).

Heterozigotni nositelji mutacije 657del5, kojih je razmjerno puno u slavenskoj populaciji Srednje Europe, pridonose i povećanoj incidenciji non-Hodgkinovog limfoma, posebice probavnog sustava i povećanoj incidenciji sporadičnog karcinoma dojke (62,63).

Najnoviji rezultati pokazuju da žene heterozigoti za mutaciju 657del5 u Srednjoj i Istočnoj Europi imaju nasljednu sklonost razvoja karcinoma dojke (64). Žene nositeljice te mutacije imaju i povećani rizik razvoja karcinoma jajnika (65).

### 1.3.2.2. Mogući utjecaj mutacije gena NBS1 u patogenezi akutnih leukemija

Studije su pokazale povezanosti između alela 657del5 gena NBS1 i povećanog rizika razvoja zloćudne bolesti limfatičnog tkiva istraživanjem populacije djece u Njemačkoj koja su bolovala od akutne leukemije. Pronađena je visoka incidencija heterozigota za deleciju 657del5, ali i nekih drugih, poglavito točkastih, mutacija gena NBS1. Posebice su praćene mutacije u dijelu gena koji kodira funkcionalne dijelove nibrina. Istraživanje je opisalo moguću ulogu nibrina u napredovanju akutne leukemije, a vjerojatno i u patogenezi te bolesti (66,67).

Kasnije provedena studija u Poljskoj pokazala je da među djecom koja boluju od ALL ima razmjerno veliki broj heterozigota za različite mutacije gena NBS1. Posebice važna pokazala se točkasta mutacija gena NBS1 koja je uzrokovala zamjenu adenina (A) u gvanin (G) A→G na mjestu 511 u ekzonu pet, s posljedičnom zamjenom aminokiseline izoleucin valinom na mjestu 171 u bjelančevini (I171V). Ta mutacija nalazi se u dijelu gena koji kodira evolucijski očuvan N-kraj nazvan BRCT, koji je funkcionalno vrlo važan budući da je uključen u popravak lomova dvolančane DNA i regulaciju kontrolnih točaka staničnog ciklusa. Zaključak te studije je da mutacija I171V predstavlja mogući rizični čimbenik u patogenezi ALL. Mehanizam tog djelovanja mogao bi biti dominantno negativni učinak. Nastaje tako što mutirani nibrin gradi polimere sa strukturno normalnim, te tako inaktivira djelovanje normalnog nibrina. U sklopu toga učinka nastojalo se razjasniti djelovanje mutirane bjelančevine u stanicama tumorskog tkiva (68).

U studiji u Velikoj Britaniji testirana je prisutnost različitih mutacija gena NSB1 u djece koja su imala akutne leukemije i limfome, ali nije pokazana značajno veća učestalost heterozigota za istraživane mutacije u odnosu na zdrave ispitanike (69,70).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj provedenog istraživanja na uzorcima bolesnika koji boluju od zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva i zdravih ispitanika je:

1. Ustvrditi učestalost alela C609T gena NQO1 u uzorku dalmatinske populacije, te pokazati značaj tog polimorfizma za razvoj različitih oblika zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva.
2. Ispitati pojavljuje li se delecija 657del5 gena NSB1 kod uzorka bolesnika koji boluju od zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva dalmatinske populacije, koja je općenito učestalija u naroda slavenskog podrijetla.
3. Usporediti učestalost opisanih pojedinačnih genskih promjena (polimorfizma C609T i delecije 657del5) i njihove kombinacije u uzorcima bolesnika i zdravih ispitanika.

Kod obje genske promjene (polimorfizam C609T i delecije 657del5) javlja se snižena ili nedostatna funkcija njihovih genskih produkata (proteina), koji su važni za održavanje homeostaze krvotvornih stanica. Zbog toga očekujemo da ćemo pokazati povezanost navedenih promijenjenih alela s bazičnom klonskom promjenom u kariotipu bolesnika te tako pridonijeti razumijevanju složenog mehanizma razvoja zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva.

### **3. ISPITANICI I METODE RADA**

#### **3.1. Ispitanici**

Istraživanje je provedeno tako da je po slučaju odabrano 82 ispitanika iz velike skupine od 1015 bolesnika sa zloćudnim bolestima krvotvornog tkiva. U njih je, po kliničkim indikacijama, određen kariotip iz koštane srži pri Citogenetskom laboratoriju KBC Split u vremenskom razdoblju od siječnja 1996. do prosinca 2007. godine. Kontrolnu skupinu od 99 ispitanika činile su zdrave osobe, slične dobne raspodjele, rodbinski nepovezane, a kriterij uključenja bio je anamnestički podatak o nepostojanju neke općenito zloćudne bolesti bilo u ispitanika ili obitelji.

#### **Poštivanje etike**

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split i Medicinskog fakulteta u Splitu. U istraživanju su se poštivala etička načela u skladu s etičkim normama određenim hrvatskim zakonima (Hrvatski liječnički zbor – Kodeks medicinske etike i deontologije, Zagreb, 2002) i međunarodnim konvencijama (World Medical Association Declaration of Helsinki – 52<sup>nd</sup> WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October, 2000.).

Koštana srži ili krv ispitanika uzimala se uz njihovu suglasnost ili suglasnost roditelja, ali uz odobrenje predstojnika Klinika.



### 3.2. Citogenetska analiza koštane srži

Svim bolesnim ispitanicima određen je kariotip iz koštane srži standardom citogenetskom tehnikom G-T-G (engl. *Giemsa-Trypsin-Giemsa*, GTG) pruganja pri Citogenetskom laboratoriju, KBC Split (71).

Za citogenetsku analizu korišteni su uzorci koštane srži dobiveni aspiracijom ili biopsijom koštane srži. Stanice su uzgajane kratkotrajno 24-satnom kulturom. Tehnika se temelji na preparaciji metafaza i omogućava otkrivanje kromosomskih aberacija, i to brojčanih i strukturnih, u svrhu otkrivanja bazične klonske promjene.

Za opis i objektivizaciju nađenih kromosomskih promjena korišten je Međunarodni sustav za humanu citogenetsku nomenklaturu (engl. *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, ISCN) (72). Kriteriji za klasičnu citogenetsku analizu, radi određivanja kariotipa svakog pojedinca, bio je nalaz više od deset metafaza, dok se za dokaz leukemijskog klona uzimao nalaz istih ili iste promjene u kariogramu i to u najmanje tri metafaze.

#### Opis postupka 24-satne kulture koštane srži:

Oko 1 ml koštane srži doda se u sterilnu epruvetu s 5 ml hranilišta (*Chromosome kit and medium M, Euroclone, Milano, Italy*) i uzgaja prema uputama proizvođača. Suspenzija se inkubira uz 0,1 ml otopine A u vodoravnom položaju na 37°C preko noći. Nakon 17-18 sati dodaje se otopina B i inkubira daljnjih 5 h na 37°C. Na kraju se dodaje citostatik Colcemid (40 µl, 0,04% ) i nastavi s inkubacijom od 40 minuta pod istim uvjetima.

Suspenzija se zatim centrifugira na 2000 rpm (oketaja u minuti) kroz 10 minuta, odstrani se supernatant, ostavi oko 0,5 ml staničnog taloga i dobro promiješa. Potom se doda 5 ml hipotonične otopine KCl (0,75 M otopine) i ostavi stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Suspenzija se ponovo centrifugira pri istim uvjetima i na kraju se doda 5 ml prilagođene otopine IBRAM (5% octene kiseline + 3% metanola u vodi) i ostavi stajati 5 minuta. Postupak centrifugiranja se ponovi, a suspenziji se doda 5 ml svježije hladne otopine Carnoy za fiksaciju (3:1 omjer metanol:octena kiselina) i ostavi stajati deset minuta. Nakon toga ponavljamo postupak centrifugiranja i resuspendiranja barem tri puta (toliko puta koliko je potrebno da talog postane čist). Nakon toga stavimo nekoliko kapi resuspendiranog staničnog taloga na suho i čisto staklo, te ostavimo sušiti na zraku. Slijedi GTG-bojanje i analiza pod svjetlosnim mikroskopom (Zeiss, Njemačka).

### **3.3. Molekularne metode i interpretacija nalaza**

#### **3.3.1. Izdvajanje deoksiribonukleinske kiseline**

Izolacija genomske DNA je učinjena za pojedine bolesnike iz ostatka suspenzije stanica koštane srži koja je bila fiksirana u mješavini metanola i octene kiseline (omjer 3:1). DNA je pohranjena na -20°C, nakon što je ustvrđen kariotip bolesnika. U drugih, uglavnom *de novo* bolesnika, genomska DNA je izolirana iz svježeg uzorka koštane srži s heparinom i to u koncentraciji od 10-30 jedinica po mililitru koštane srži ili iz pune krvi u EDTA (7,5% K<sub>3</sub>EDTA), a kod kontrolne skupine isključivo iz pune krvi. Izolacija

genomske DNA izvršena je setom kemikalija *QIAamp DNA Blood Miny Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka), prema uputama proizvođača.

Metoda izolacije se sastojala od nekoliko faza: razbijanja stanica i jezgra, uništavanja svih staničnih proteina, ribonukleinske kiseline (engl. *ribonucleic acid*, RNA) i ostalih makromolekula, oslobađanja i čišćenja DNA od preostalih proteina i skladištenja DNA. Protokol za izolaciju DNA je napisan u nastavku:

1. 20 µl PROTEAZE K se ispipetira u dno 1,5 ml tubice u koju se dolije 200 µl krvi i 200 µl PUFERA AL. Smjesa se inkubira na 56°C/10 minuta.
2. Kratko se centrifugira (~5 s) da bi se odstranile kapljice s unutrašnje stijenke tubice. U smjesu se doda 200 µl ETANOLA, izmiješa i ponovo kratko centrifugira.
3. Pipetom se prebaci čitava smjesa (~650 µl) u filter-tubicu (engl. *spin column*) i centrifugira na 8000 rpm (okretaja u minuti) 1 minutu.
4. Filter-tubica se prebaci u tubicu za sakupljanje (engl. *collection tube*). U filter-tubicu se doda 500 µl PUFERA AW1. Centrifugira se na 8000 rpm/1 minutu.
5. Filter-tubica se ponovo prebaci u novu tubicu za sakupljanje, a prethodna s filtratom se baci. Doda se 500 µl PUFERA AW2 i centrifugira na 13 200 rpm/3 minute.
6. Filter-tubica se prebaci u prethodno obilježenu čistu tubicu od 2 ml, tubica za sakupljanje s filtratom se baci. Doda se 200 µl PUFERA AE, inkubira se na sobnoj temperaturi 1 minutu i centrifugira na 8000 rpm/1 minutu.

7. U 2 ml tubici se nakon centrifugiranja odfiltrira genomska DNA koja je otopljena u AE puferu. Ovaj pufer služi i za čuvanje DNA.

Uspješnost izolacije DNA provjeri se vizualiziranjem DNA na 1,5% agaroznom gelu u vodoravnoj elektroforezi (opis dalje u tekstu).

Koncentracija izolirane DNA određena je mjerenjem na spektrofotometru (Perkin Elmer UV/VIS Spectrofotometer Lambda Bio 40, Waltham, SAD). Prosječna koncentracija je iznosila oko 30 µg/ml. Za metodu genotipiziranja uzorak je bio razrijeđen do koncentracije od 10 ng/µl.

### **3.3.2. Polimerazna lančana reakcija i određivanje polimorfizma analizom duljine restrikcijskih ulomaka za gen NQO1**

Umnožavanje željenog odsječka slijeda nukleotida DNA za gen NQO1 napravili smo postupkom polimerazne lančane reakcije (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) opisane već ranije, uporabom uređaja za PCR (Applied Biosystems, Foster City, USA) (73). Rezultati duljine restrikcijskih ulomaka određeni su elektroforezom na 8% poliakrilamidnog gela (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) ili na 3% agaroznom gelu (Sigma-Aldrich).

PCR je postupak umnožavanja odabranih odsječaka DNA s pomoću specifičnih početnih oligonukleotida (engl. *primers*). Sastoji se od niza ponavljajućih ciklusa koji se temelje na korištenju termostabilne DNA-polimeraze, u proizvodnji velikog broja kopija određene sekvence, počevši od vrlo male količine biološkog materijala. Reakcija

obuhvaća oko 30-40 ponavljajućih ciklusa grijanja i hlađenja i na kraju nastaje milijarda kopija odsječaka DNA koji se u daljnjem procesu genotipizacije cijepaju (kidaju, režu, digestiraju) s restrikcijskim endonukleazama specifičnim za pojedini polimorfizam. Na ovaj način se određuju aleli, odnosno genotip pojedinca. Restrikcijske endonukleaze su enzimi iz bakterija koji prepoznaju i cijepaju točno određeni redoslijed baza u DNA-uzvojnici. Postupci analize rekombinantne DNA dokazali su da često postoje individualne razlike u slijedu nukleotida na određenom mjestu u zdravoj populaciji. Razlika u samo jednom paru nukleotida na određenom mjestu u kromosomu može uzrokovati nastanak ili nestanak mjesta cijepanja restrikcijskog enzima. Posljedica te razlike je promjena u duljini restrikcijskih ulomaka nakon enzimske razgradnje. Analizom duljine restrikcijskih ulomaka (engl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP) može se odrediti genotip pojedinca. Ako je pojedinac homozigotan za odsustvo reznog mjesta tada se analizom RFLP-a ustvrdi postojanje samo jednog velikog odsječka DNA, kod heterozigota se ustvrde tri odsječka (jedan veliki i dva manja), a kod homozigota za prisustvo reznog mjesta se ustvrde dva manja odsječka.

Mjesto DNA, koje uključuje polimorfizam C609T (NQO1\*2) gena NQO1, umnoženo je sa specifičnim početnim oligonukleoidima prema ranije opisanom postupku (31).

**NQO1 F (5'-AAG CCCAGACCAACT TCT-3')**

**DT-2 (5'-TCT CCT CATCCT GTA CCT CT-3')**

Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimeraze sadržavala je:

1. 1 µg ispitivane DNA koncentracije 10 ng/µl,
2. 100 ng odgovarajućih početnih oligonukleotida,

3. 1 U Taq-polimeraze,
4. dATP, dCTP, dGTP i dTTP do konačne koncentracije 10 mmol/l,
5. MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/l,
6. 5 µl 10X reakcijskog pufera,
7. konačni volumen reakcijske smjese iznosi 25µl.

Uvjeti PCR reakcije: 40 ciklusa denaturacija pri 94°C u trajanju od 50 sekundi, vezanja pri 52°C u trajanju od 50 sekundi i produljivanja lanaca pri 72°C u trajanju od 30 sekundi, te krajnje produživanje u trajanju od 10 minuta na 72°C. Veličina produkta reakcije PCR je 304 parova baza. Uzorci dobiveni umnožavanjem reakcijom PCR dalje su analizirani vodoravnom elektroforezom na agaroznom gelu udjela agaroze 1.5% (Sigma-Aldrich).

Analiza genskog polimorfizma je učinjena analizom duljine restrikcijskih ulomaka RFLP na sljedeći način:

Za reakciju je bilo potrebno 10 µl PCR-produkta, 1 µl 10X reakcijskog pufera i 5 jedinica enzima *HinfI* (Fermentas, Burlington, Canada ). Smjesa za RFLP se inkubirala preko noći u termobloku (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na temperaturi od 37°C.

Svi PCR-produkti imaju jedno zajedničko restrikcijsko mjesto za enzim *HinfI* koji reže 33 bp od svakog PCR-produkta prikazujući kontrolu razgradnje (digestije), tako da je preostali fragment dužine 271 bp. Drugo mjesto djelovanja enzima prisutno je ako postoji polimorfizam. Nakom djelovanja enzima određuje se duljina nastalih restrikcijskih produkata i prema tome procjenjuje postojanje polimorfizma analizom na

agaroznom gelu udjela agaroze 3% (Sigma-Aldrich) s biljegom veličine svakih 20 bp (Rosch, Mannheim, Germany).

Veličine PCR-produkata:

1. Nepocjepani PCR-produkt : 304 bp.
2. PCR-produkt veličine 271 bp dobiva se u homozigota koji nemaju polimorfizam, a označavaju se kao NQO1\*1/1 ili C/C.
3. PCR-produkti veličine 271, 151 i 120 bp dobivaju se u heterozigotnog genotipa, koji se označava NQO1\*1/2 ili C/T.
4. PCR-produkti veličine 151 i 120 bp dobivaju se u homozigota koji imaju polimorfizam, a označavaju se kao NQO1\*2/2 ili T/T.

**3.3.3. Polimerazna lančana reakcija za određivanje delecije mutacije  
657del5 gena NBS1**

Dio DNA koji uključuje deleciju mutaciju 657del5 u šestom ekzonu gena NBS1 umnožen je s pomoću specifičnih početnih oligonukleotida prema ranije opisanom postupku (74):

**657del5 F (5- AAT-GTT-GAT-CTG-TCA-GGA-CG)**

**657del5 R (5- TAT-AAA-TGT-TTT-CCC-TTT-GAA-GA)**

Reakcijska smjesa za PCR sadržavala je:

1. 1 µg ispitivane DNA koncentracije 10 ng/µl,

2. 100 ng odgovarajućih početnih oligonukleotida,
3. 1 U Taq polimeraze,
4. dATP, dCTP, dGTP i dTTP do konačne koncentracije 10 mmol/l,
5. MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/l,
6. 5 µl 10X reakcijskog pufera,
7. konačni volumen reakcijske smjese iznosi 25 µl.

Uvjeti PCR-reakcije: početna denaturacija 95°C u trajanju od 5 minuta, zatim 35 ciklusa denaturacije na 95°C u trajanju od 1 minute, vezanja na 55°C tijekom 1 minute i produžavanja na 72°C tijekom 2,5 minute. PCR-prодукti su analizirani elektroforezom u visokorezolucijskom 8% poliakrilamidnom gelu s biljekom veličine svakih 20 bp (Rosch).

PCR-produkti dobivenim umnažanjem analizirani su i prikazani na sljedeći način:

1. Jedan PCR-produkt veličine 55 bp nalazi se u homozigota za deleciju i označava 657del5/657del5.
2. Dva PCR-produkta veličine 55 i 60 bp nalaze se u heterozigota za deleciju i označavaju 657del5/N.
3. Jedan PCR-produkt veličine 60 bp nalazi se u zdravih homozigota bez delecije i označava N/N.



## Statistička analiza podataka

Statistička obrada razlika u zastupljenosti određenog genotipa (polimorfizma) između bolesnika i kontrolnih ispitanika i njihovih podskupina provedena je pomoću hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testa upotrebom statističkog programa MedCalc (Mariakerke, Belgija) i prikazana vrijednošću testa, stupnjevima slobode (DF) i vrijednošću p. Razina značajnosti za analizu rezultata postavljena je na vrijednost  $\alpha < 0,05$ . Za podatke o zastupljenosti polimorfizma u skupini bolesnika i zdravih ispitanika izračunat je i omjer izgleda (prema engl. *odds ratio*) uz raspon pouzdanosti CI 95% (prema engl. *confidence interval*), tj. koliki su izgledi da će se bolest pojaviti ukoliko postoji polimorfizam, pomoću istog programa (MedCalc).

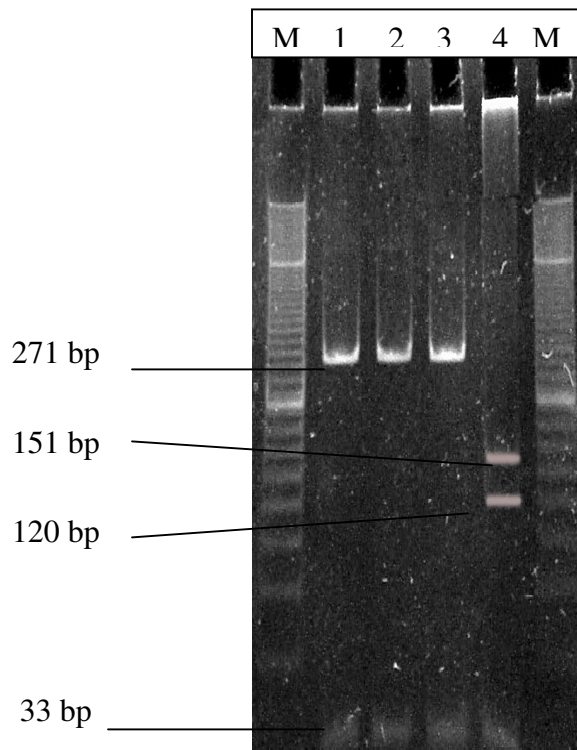
Za polimorfizam C609T gena NQO1 potrebnu veličinu uzorka procijenili smo očekujući učestalost polimorfnog alela T od 20% u bolesnika te 2% u zdravih ispitanika. Uz 80% snage i vrijednost  $\alpha = 0,05$ , izračunali smo da nam je potrebno 44 ispitanika po skupini korištenjem statističkog programa MedCalc.

Za prikaz učestalosti polimorfnog alela T gena NQO1 koristili smo se Hardy-Weinbergovom jednadžbom:  $p(A) = [(2 \times AA) + Aa/aA] / 2 \times (AA + Aa + aa)$  gdje je p oznaka za učestalost, a A oznaka za polimorfni alel. Ako se uoči neravnomjerna raspodjela učestalosti alela između skupina oboljelih i zdravih ispitanika, onda to upućuje na povezanost gena i bolesti (8).

Delecijska mutacija je strogo specifična za narode slavenskog podrijetla i nismo posebno procjenjivali potrebnu veličinu skupine.

#### 4. REZULTATI RADA

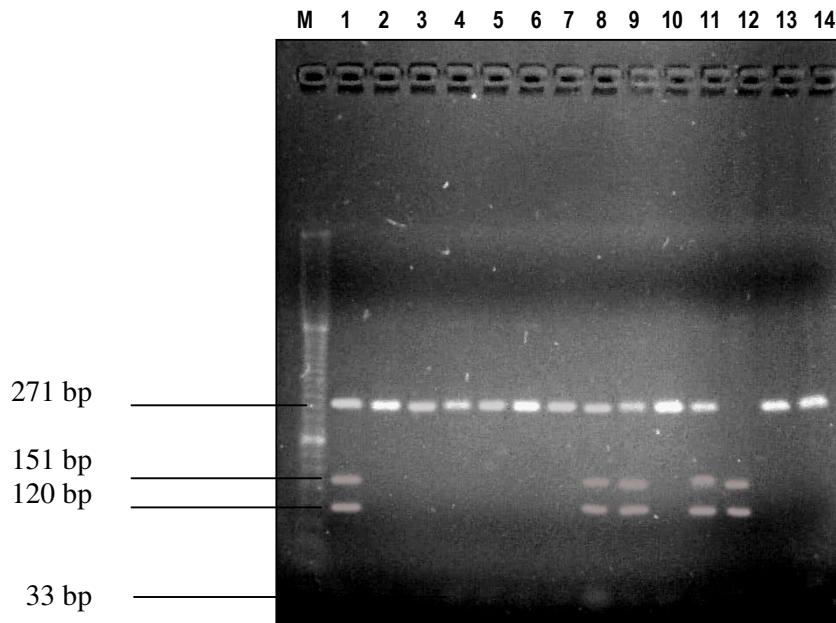
Nakon umnažanja odsječaka gena NQO1 postupkom PCR dobiju se produkti veličine 304 bp, koje smo podvrgli restrikciji s enzimom *HinfI*. Slike 6 i 7 prikazuju veličine produkata reprezentativnih uzoraka dobivenih cijepanjem s restrikcijskom endonukleazom.



*Slika 6. Rezultati analize PCR-RFLP polimorfizma C609T gena NQO1 dobiveni elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu.*

Svi PCR-produkti imaju zajedničko restrikcijsko mjesto za enzim *HinfI* koji reže 33 bp od svakog PCR-produkta prikazujući kontrolu digestije. Drugo mjesto djelovanja enzima prisutno je kada postoji polimorfizam, pa u slučaju postojanja reznog mjesta

nastaju odsječci dužine 151 i 120 bp, a ako reznog mjesta nema ostaje odsječak veličine 271bp [(304bp -33 bp)=271 bp]. M – DNA-biljeg veličine odsječaka od 20 bp; uzorci 1-3 nemaju režno mjesto, homozigoti (C/C) za polimorfizam C609T; uzorak 4 ima režno mjesto na oba alela, homozigot (T/T) za navedeni polimorfizam.

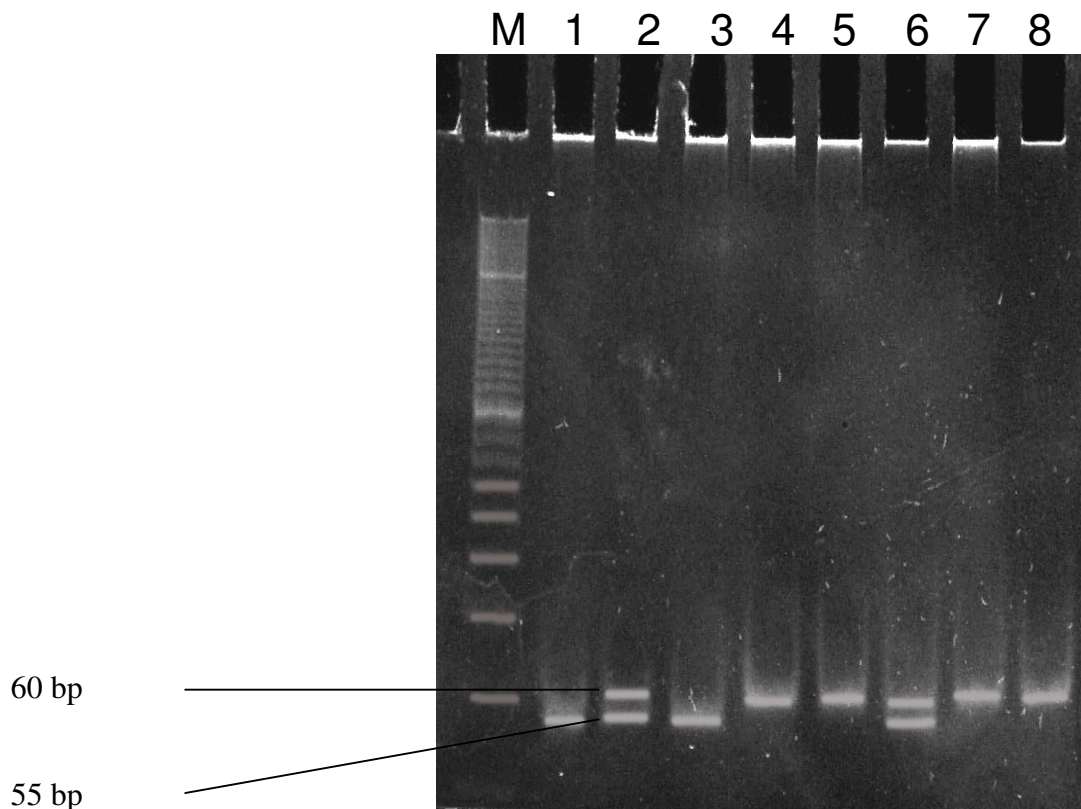


*Slika 7. Rezultati analize PCR-RFLP polimorfizma C609T gena NQO1 u reprezentativnim uzorcima 14 ispitanika na agaroznom gelu s 3% agaroze.*

Produkt veličine 33 bp prisutan je u svim uzorcima i prikazuje kontrolu digestije. PCR-produkt stanica uzoraka koji nemaju navedeni polimorfizam dug je 271 bp. Kada je polimorfizam C609T prisutan, PCR-produkt sadrži režno mjesto za enzim *HinfI*, pa nastaju produkti veličine 151 i 120 bp. M – DNA-biljeg veličine odsječaka od 20 bp;

uzorci 1, 8, 9 i 11 su heterozigoti (C/T) za navedeni polimorfizam; uzorak 12 je homozigot za prisutno režno mjesto (T/T); uzorci 2 do 7, 13 i 14 su homozigoti (C/C) bez prisutnog reznog mjesta.

Nakon umnažanja odsječka gena NBS1 elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu na temelju duljine PCR-produkata ustvrđi se postoji li delecijaska mutacija (657del5) ili ne. Rezultati analize prikazani su na slici 8.



*Slika 8. Rezultati analize elektroforeze PCR-produkata delecije 657del5 gena NBS1 na 8% poliakrilamidnom gelu.*

PCR-produkt veličine 60 bp označava alel bez delecije, dok PCR-produkt veličine 55 bp označava alel s delecijaskom mutacijom 675del5. M – DNA-biljeg veličine

odsječaka; uzorci 1 i 3 su homozigoti za 657del5 (657del5/657del5); uzorci 2 i 6 su heterozigoti (657del5/N); uzorci 4, 5, 8 i 9 su zdravi homozigoti (N/N).

Istraživanje je provedeno na dvije skupine: skupini od 82 bolesnika i usporednoj skupini od 99 zdravih ispitanika. Skupinu bolesnika prema kliničkim značajkama podijelili smo u dvije skupine: one sa zloćudnim bolestima mijeloidne i sa zloćudnim bolestima limfoidne loze.

*Tablica 6. Značajke bolesnika koji boluju od zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva i zdrave skupine ispitanika*

|                                  | Broj bolesnika (%) | Broj zdravih (%) | $\chi^2$ (DF)* p      |
|----------------------------------|--------------------|------------------|-----------------------|
| <b>Ukupno</b>                    | <b>82</b>          | <b>99</b>        |                       |
| <b>Dob pri dijagnozi</b>         |                    |                  |                       |
| Djeca (0,3-17,0 g.)              | 26 (32)            | 38 (38,4)        |                       |
| Odrasli (34-82 g.)               | 56 (68)            | 61(61,6)         | <b>0,60 (1) 0,607</b> |
| <b>Spol</b>                      |                    |                  |                       |
| Muškarci                         | 48 (58)            | 54 (54,5)        |                       |
| Žene                             | 34(42)             | 45(45,5)         | <b>0,15 (1) 0,698</b> |
| <b>Dijagnoza</b>                 |                    |                  |                       |
| Zloćudne bolesti mijeloidne loze | 62 (76)            |                  |                       |
| Zloćudne bolesti limfoidne loze  | 20 (24)            |                  |                       |

\* DF – stupnjevi slobode (engl. *degree of freedom*)

Većinom su bolesnici bili odrasle osobe i to poglavito starije životne dobi, s medijanom od 58 godina (raspon 34 do 82 godine) i s dijagnozom zloćudne bolesti

mijeloidne loze. Bolesnici dječje dobi, uključeni u istraživanje, imali su vrijednost medijana dobi od 8,5 godina (raspon 0,3 do 17 godina), najčešće s dijagnozom akutne limfoblastične leukemije (ALL u 20 bolesnika). Ispitivana i kontrolna skupina bile su usklađene po dobi i spolu.

Zastupljenost genotipova ispitivanog polimorfnog alela C609T gena NQO1 i Slavenske mutacije 657del5 gena NBS1 u uzorku bolesnika koji boluju od zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva i kontrolnih ispitanika dalmatinske populacije prikazana je u tablici 7.

*Tablica 7. Raspodjela genotipova polimorfnog alela C609T gena NQO1 i mutacije 657del5 gena NBS1 kod skupine bolesnika koji boluju od zloćudne bolesti krvotvornog tkiva i skupine zdravih ispitanika*

| <b>Genotip</b>         | <b>Skupina bolesnika<br/>n = 82, broj</b> | <b>Kontrolna skupina<br/>n = 99, broj</b> | <b><math>\chi^2</math> (DF)* p</b> |
|------------------------|---|---|------------------------------------|
| <b>NQO1: C/C</b>       | <b>50</b>                                 | <b>78</b>                                 |                                    |
| <b>C/T</b>             | <b>30</b>                                 | <b>20</b>                                 | <b><u>6,93 (2) 0,031</u></b>       |
| <b>T/T</b>             | <b>2</b>                                  | <b>1</b>                                  |                                    |
| <b>NBS1: N/N</b>       | <b>80</b>                                 | <b>99</b>                                 |                                    |
| <b>657del5/N</b>       | <b>1</b>                                  | <b>0</b>                                  | <b>2,44 (2) 0,295</b>              |
| <b>657del5/657del5</b> | <b>1</b>                                  | <b>0</b>                                  |                                    |

\* DF – stupnjevi slobode (engl. *degree of freedom*)

Analiza ustvrđenog broja uzoraka koji su imali mutaciju C609T gena za metabolički enzim NQO1 pokazala je statistički značajnu razliku među skupinama oboljelih i zdravih ( $\chi^2 = 6,93$ , DF=2, p = 0,031).

Učestalost polimorfnog alela T gena NQO1 u kontrolnoj skupini od 99 ispitanika izračunata Hardy-Weinbergovom jednadžbom iznosila je 11,1%, dok je među oboljelima ta učestalost gotovo dva puta veća (20,7%).

Slavska mutacija 657del5 gena NSB1 pronađena je samo u skupini oboljelih i to u dva uzorka (jedan homozigot i jedan heterozigot), a nije pronađena u usporednoj kontrolnoj skupini od 99 ispitanika. Potrebno je uključiti veći broj ispitanika kako bi se dalje analizirala važnost ove rijetke mutacije patognomične za narode slavenskog podrijetla u patogenezi zloćudnih hematopoetskih bolesti.

Omjer izgleda koji određuje izgled (rizik) da se bolest pojavi ukoliko postoji navedeni polimorfizam gena NQO1 iznosi 2,38 (uz 95% CI 1,23 do 4,58).

S obzirom da djeca češće oboljevaju od tumora limfoidne loze, a odrasli od tumora mijeloidne loze napravljena je raspodjela genotipova polimorfnog alela C609T gena NQO1 prema dobi bolesnika, što je prikazano u tablici 8.

Tablica 8. Raspodjela genotipova polimorfnog alela C609T gena NQO1 prema dobnim skupinama bolesnika sa zloćudnim bolestima krvotvornog tkiva

| Genotip       | Broj (0,3-17 godina)<br>djeca | Broj (38-82 godina)<br>odrasli | $\chi^2$ (DF)* | p     |
|---------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------|-------|
| NQO1: C/C     | 16                            | 34                             |                |       |
| C/T           | 10                            | 20                             | 0,97 (2)       | 0,617 |
| T/T           | 0                             | 2                              |                |       |
| <b>Ukupno</b> | <b>26</b>                     | <b>56</b>                      |                |       |

\* DF – stupnjevi slobode (engl. *degree of freedom*)

Učestalosti pojavljivanja ispitivanog polimorfizma C609T gena NQO1 u ranijoj životnoj dobi (10/26) slična je učestalosti u starijoj životnoj dobi (22/56) i između tih skupina nema statistički značajne razlike.

Testiranjem učestalosti polimorfizma NQO1 samo u odraslih bolesnika (56 ispitanika) u odnosu na kontrolnu skupinu (99 ispitanika) dobili smo graničnu razliku između skupina s učestalijim pojavljivanjem u bolesnika ( $\chi^2=6,16$ , DF=2, p=0,046). Omjer izgleda (izgled razvoja bolesti) iznosio je 2,40 (95% CI, 1,17 do 4,94).

Tablica 9 pokazuje raspodjelu genotipova za polimorfizam C609T gena NQO1 u svih oboljelih od zloćudne bolesti mijeloidne loze, dakle 56 odraslih i 6 ispitanika dječje dobi. Primarni poremećaji mijeloidne loze utvrđeni u bolesnika navedeni su u istoj tablici i to: CML, AML, MDS i PRV.



Tablica 9. Raspodjela genotipova za polimorfni alel C609T gena NQO1 u uzorku bolesnika koji boluju od različitih primarnih zloćudnih bolesti mijeloidne loze (nastalih de novo)

| Broj ispitanika                               | ukupno | C/C | C/T | T/T | $\chi^2$ (DF)*p       |
|---|--------|-----|-----|-----|-----------------------|
| Kontrolna skupina                             | 99     | 78  | 20  | 1   |                       |
| Bolesnici                                     | 62     | 38  | 24  | 2   | <b>7,31 (2) 0,026</b> |
| <b>Dijagnoza:</b>                             |        |     |     |     |                       |
| Mijeloproliferativna bolest (neklasificirana) | 15     | 7   | 7   | 1   |                       |
| CML   | 15     | 10  | 5   | 0   |                       |
| PRV   | 9      | 5   | 3   | 1   |                       |
| MDS   | 10     | 7   | 3   | 0   |                       |
| AML   | 13     | 9   | 4   | 0   |                       |

- DF – stupnjevi slobode (engl. *degree of freedom*)

Homozigotni polimorfni aleli pronađeni su samo u 2 bolesnika. Heterozigotni genotip podjednako je zastupljen u svim vrstama zloćudnih bolesti mijeloidne loze. Najučestaliji je u skupini neklasificirane mijeloproliferativne bolesti (7/15), a najmanje prisutan u skupini MDS (3/10). Analiza ustvrđenog broja uzoraka, koji su imali mutaciju C609T gena za metabolički enzim NQO1, pokazala je statistički značajnu razliku među skupinama oboljelih od bolesti mijeloidne loze i zdravih ispitanika ( $\chi^2 = 7,31$ ,  $p = 0,026$ ).

Omjer izgleda za sve ispitanike sa zloćudnom bolešću mijeloidne loze iznosi 2,35 (95% CI 1,16 do 4,74), što je nešto manje od omjera izgleda za odrasle bolesnike

(ukupno 56), koji je iznosio 2,40. To ukazuje na nešto bolju povezanost ispitivanog polimorfizma s razvojem bolesti u odraslih, i to bolesti mijeloidne loze.

Tablica 9 prikazuje i raspodjelu odraslih bolesnika prema dijagnozama [bolesti mijeloidne loze], dok je prikaz bolesne djece prema dijagnozama [poglavito bolesti limfoidne loze (n=20) i manje mijeloidne loze (n=6)] u odnosu na polimorfizam C609T gena NQO1 naveden u tablici 10.

*Tablica 10. Raspodjela genotipova za polimorfni alel C609T gena NQO1 u skupini bolesnika dječje dobi koji boluju od leukemije*

|                          | Broj<br>ukupno | NQO1 C609T |           |          | $\chi^2$ (DF) * p     |
|--------------------------|----------------|------------|-----------|----------|-----------------------|
|                          |                | C/C        | C/T       | T/T      |                       |
| <b>Kontrolna skupina</b> | <b>99</b>      | <b>78</b>  | <b>20</b> | <b>1</b> |                       |
| <b>Bolesnici</b>         | <b>26</b>      | <b>16</b>  | <b>10</b> | <b>0</b> | <b>3,94 (2) 0,140</b> |
| <b>Dijagnoze:</b>        |                |            |           |          |                       |
| ALL                      | 20             | 12         | 8         | 0        |                       |
| AML                      | 3              | 1          | 2         | 0        |                       |
| CML (juv.)               | 1              | 1          | 0         | 0        |                       |
| MDS                      | 2              | 2          | 0         | 0        |                       |

\* DF – stupnjevi slobode (engl. *degree of freedom*)

Raspodjela genotipova alela C609T gena NQO1 između bolesne djece i kontrolne skupine prikazana je u tablici 10. Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2 = 3,94$ ,  $p = 0,140$ ), vjerojatno zbog razmjerno malog broja bolesnika.

Pri postavljanju dijagnoze u svih bolesnika određivan je kariotip iz koštane srži. Tablica 11 pokazuje raspodjelu učestalosti genotipova polimorfnog alela C609T gena NQO1 prema citogenetskim nalazima.

*Tablica 11. Prikaz citogenetskih klonalnih promjena u odnosu na polimorfizam C609T gena NQO1 u 82 bolesnika sa zloćudnom bolesti krvotvornog tkiva*

| Citogenetski nalaz u kariotipu | Broj bolesnika | Broj bolesnika određenog genotipa |           |          |
|--------------------------------|----------------|-----------------------------------|-----------|----------|
|                                |                | C/C                               | C/T       | T/T      |
| Strukturna promjena            | 24             | 14                                | 10        | 0        |
| Brojčana promjena              | 8              | 5                                 | 3         | 0        |
| Brojčana i strukturna promjena | 9              | 6                                 | 3         | 0        |
| Normalni nalaz                 | 36             | 22                                | 12        | 2        |
| Nedostupni nalaz               | 5              | 3                                 | 2         | 0        |
| <b>Ukupno</b>                  | <b>82</b>      | <b>50</b>                         | <b>30</b> | <b>2</b> |

Uspoređujući bolesnike s normalnim kariotipom s onima koji imaju promijenjeni nalaz nije nađena značajna razlika ( $\chi^2 = 2,45$ ,  $DF=2$ ,  $p = 0,294$ ) u odnosu na polimorfizam C609T. Dva ispitanika, homozigoti polimorfnog biljega C609T (T/T), imala su normalni kariotip (2/36), dok je 12 od 36 ispitanika normalnog karitipa imalo heterozigotni polimorfizam (C/T). Među bolesnicima (n=41) s citogenetskim promjenama, 16 ih je imalo heterozigotni polimorfizam (C/T), s tim da je polimorfizam najčešće potvrđen među bolesnicima sa strukturnim promjenama u kariotipu (10/24).

Specifične promjene u kariotipu u oboljelih ispitanika u odnosu na genotip gena NQO1 prikazane su u tablici 12.

*Tablica 12. Prikaz specifičnih citogenetskih klonalnih promjena i polimorfizma alela C609T gena NQO1 u bolesnika sa zloćudnom bolesti krvotvornog tkiva*

| Citogenska promjena | <u>NQO1 C609T</u>  |                    |
|---------------------|--------------------|--------------------|
|                     | <u>C/C</u><br>Broj | <u>C/T</u><br>Broj |
| t (9;22)            | 8                  | 4                  |
| del(20)(q11)        | 0                  | 2                  |
| abnormalnosti 17q   | 0                  | 3                  |
| hiperploidija       | 6                  | 4                  |
| druge promjene      | 11                 | 3                  |
| <b>Ukupno</b>       | <b>25</b>          | <b>16</b>          |

Od specifičnih citogenetskih klonalnih promjena najučestalija je recipročna translokacija t(9;22) i to ukupno u 12 bolesnika s CML. U četiri od tih 12 bolesnika ustvrđen je heterozigotni genotip polimorfizma C609T (C/T). Heterozigotni genotip polimorfizma C609T (C/T) ustvrđen je i u drugim citogenetskim promjenama (delecija kromosoma 20q i abnormalnost kromosoma 17q).

## 5. RASPRAVA

U provedenoj studiji pokazano je da je učestalost alela T polimorfizma C609T gena NQO1 u uzroku od 99 ispitanika dalmatinske populacije 11,1%, što je nešto niže od učestalosti alela T u sličnim studijama provedenim u bijelaca u Europi i Americi (13-25%) i to u Velikoj Britaniji 17% (100 ispitanika), Njemačkoj 13% (260 ispitanika) i Americi 16% (575 ispitanika). Učestalost alela T puno je veća u istraživanjima provedenim na uzorcima populacija Azije i Meksika: kineskoj 49% (86 ispitanika), japanskoj 38% (150 ispitanika) i meksičkoj 43% (161 ispitanik) (36,37,75-77).

Naše istraživanje pokazuje značajno više uzoraka s ustvrđenim polimorfnim nukleotidom za prisutno rezo mjesto u bolesnika sa zloćudnom bolesti krvotvornog tkiva u odnosu na zdrave ispitanike. U istih skupina izračunat je omjer izgleda i zaključeno je da kod postojanja polimorfnog nukleotida za prisutno rezo mjesto postoji veći izgled (2,38) od oboljevanja od zloćudne bolesti krvotvornog tkiva u populaciji Dalmacije, i to posebice u odrasloj dobi. Učestalost polimorfnog genotipa C609T (heterozigot-C/T i homozigota-T/T) gena NQO1 gotovo je dvostruko veća u bolesnika (39%) u odnosu na zdrave ispitanike (21%).

Nije ustvrđena statistički značajna razlika u učestalosti spomenutog polimorfizma u djece koja boluju od ALL (10/26 ili 38,4%) u odnosu na bolesnike starije životne dobi koji boluju od mijeloproliferativnih bolesti (22/56 ili 39,2%). Međutim, postoji značajna razlika u učestalosti polimorfizma između odraslih bolesnika koji boluju od zloćudne bolesti mijeloidne loze i zdravih ispitanika. Iz toga se zaključuje da postojanje

polimorfizma predstavlja rizični čimbenik za razvoj bolesti mijeloidne loze posebice u odraslih.

U našoj studiji ispitana su 62 bolesnika koja su razvila primarni poremećaj mijelopoeze od toga 15 bolesnika s CML, 9 s PRV, 10 s MDS, 13 s *de novo* AML i 15 bolesnika s neklasificiranom mijeloproliferativnom bolesti. Larson i suradnici, istraživanjem provedenim u SAD-u, ispitali su 48 bolesnika s primarnim poremećajem mijelopoeze od toga 9 s CML, 30 s MDS i 9 s *de novo* AML (36). Rezultati naše studije na uzorku dalmatinske populacije za polimorfizam C609T gena NQO1 u skupini bolesnika s primarnim poremećajem mijelopoeze pokazali su sličnu učestalost heterozigota C/T – 24 od 62 ispitanika i homozigota, T/T – 2 od 62 ispitanika kao i studija Larsona i suradnika u kojoj je potvrđena sljedeća učestalost: heterozigota C/T – 22 od 48 ispitanika i homozigota T/T - 2 od 48 ispitanika (36). U našu studiju nismo uključili bolesnike koji boluju od t-AML (zbog razmjerno malog broja ispitanika za tu vrstu zloćudne bolesti), dok su Naoe i suradnici proveli veliku studiju u Japanu na skupini od 411 bolesnika s *de novo* AML, 58 bolesnika s t-AML ili MDS nakon kemoterapije i 150 zdravih ispitanika (37). Usporedbom bolesnika s primarnom i sekundarnom leukemijom (t-AML/MDS), uočili su učestaliji nalaz polimorfnog alela T gena NQO1 kod sekundarnih nego kod primarnih poremećaja hematopoeze (37). Njihovo istraživanje potvrdilo je da je homozigotni polimorfizam C609T genotipa T/T prisutan je u visokom postotku (24,1%), kao i heterozigotni genotip C/T (46,6%) u bolesnika s t-AML i značajno povećava rizik razvoja t-AML ili MDS (36). Heterozigotna mutacija C609T genotipa C/T ustvrđena je u 39,2% bolesnika s *de novo* AML i predstavlja niski rizik razvoja bolesti, s obzirom da je učestalost alela T među zdravim ispitanicima u

uzorku od 150 ispitanika japanske populacije iznosila 38% (37). Nasuprot tome, u našem istraživanju uočili smo znatno manju učestalosti, od 11%, u zdravih ispitanika dalmatinske populacije.

Naše istraživanje u koje je uključeno 26 djece s akutnom leukemijom pokazalo je sličnu zastupljenost heterozigota (C/T) za polimorfizam C609T gena NQO1, od 38%, (10/26), kao i istraživanje Krajinovića i suradnika koji su pokazali zastupljenost od 35,6% (62/174) (40). Premda mi nismo dokazali značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu (vjerojatno zbog malog broja ispitanika), Krajinović i suradnici potvrdili su značajnu razliku u učestalosti alela T između bolesne i zdrave djece (40). U studiji provedenoj u Kanadi analizirani su uzorak bijelaca francuskog podrijetla (174 djece s ALL i 323 kontrolna ispitanika) i pokazali da značajno više nositelja jednog ili oba polimorfna alela C609T gena NQO1 pripada skupini djece s ALL (genotip C/T - 35,6% ; genotip T/T - 4,0%) nego kontrolnoj skupini zdravih ispitanika (genotip C/T – 26,0 % ; genotip T/T - 4,0%). Istom studijom dokazano je da određene vrste združenih polimorfnih genotipova za funkcionalnu promjenu tri metabolička enzima NQO1, mijeloperoksidaze i CYP2E1 značajno pridonose povećanom riziku razvoja ALL, i to više nego svaki polimorfizam pojedinačno (40).

Sirma i suradnici, u uzorku turske populacije, nisu dokazali značajne razlike u genotipskoj raspodjeli polimorfizma C609T gena NQO1 u 273 bolesnika s *de novo* akutnim leukemijama u djece u odnosu na zdravu skupinu od 286 ispitanika (41). Učestalost heterozigota u bolesnika slična je učestalosti koju smo mi pokazali dok je homozigota genotipa T/T bilo samo 2,5%. No, u njihovoj zdravoj populaciji pokazana je puno veća učestalost alela T (24,8%) u odnosu na naše istraživanje.

Dijelom različiti nalazi učestalosti polimorfizma objašnjavaju se razlikom u učestalosti alela T zdrave skupine u različitim etničkim i geografskim populacijama, moguće uvjetovane različitim evolucijskim razvojem (8).

Nadalje smo analizirali klonalne kariotipske promjene u bolesnika s obzirom na zastupljenost polimorfizma C609T gena NQO1. Nismo potvrdili značajnu razliku u raspodjeli genotipova polimorfizma C609T gena NQO1 u bolesnika sa specifičnim citogenetskim klonalnim promjenama u kariotipu (41/77) od onih s normalnim kariotipom (36/77). U ovom istraživanju klonalnost se odredila isključivo standardnom citogenetikom (GTG - pruganje), dok su ostali postupci (FISH i RT-PCR) također provedeni, ali samo u pojedinim bolesnika, pa nisu uzeti u razmatranje.

Uzorci u našem istraživanju kariotipski su vrlo različiti, stoga smo ih razvrstali u skupinu brojčanih, strukturnih ili kombiniranih promjena kromosoma. Brojčane promjene kromosoma u kariotipu imalo je 8 bolesnika, strukturne (poglavito recipročne translokacije kromosoma) 24 bolesnika, dok je kompleksne promjene kariotipa (strukturne i brojčane promjene kromosoma) s više patoloških klonova imalo 9 bolesnika. Analizom klonalnih citogenetskih promjena kariotipa u stanicama koštane srži nismo ustvrdili niti jedan homozigotni polimorfizam C609T genotipa T/T u skupini od 41 bolesnika s klonalnim promjenama, dok su dva bolesnika pokazala homozigotni polimorfizam C609T genotipa T/T u skupini od 36 bolesnika bez klonalnih promjena kariotipa.

Larson i suradnici nisu pronašli homozigotni polimorfizam C609T genotipa T/T među 33 bolesnika s recipročnim translokacijama, dok je istraživanje učestalosti alela T u tim kromosomskim promjenama slična onoj u općoj populaciji (36). Međutim, pronašli



su da je učestalost alela T povećana za 1,6 puta kod aberacija kromosoma 5 i 7 (36). Studija koju je proveo Smith i suradnici (35) pokazala je najveću učestalost polimorfnog alela T kod inverzije kromosoma 16 (inv(16)) u bolesnika oboljelih od AML. U našoj studiji samo je jedan bolesnik imao inv(16), ali uz genotip C/C. Pronašli smo heterozigotni genotip C/T kod aberacije kromosoma 17q u 3 bolesnika, a riječ je bila o translokacijama (15;17), (11;17) i izokromosomu 17q. Deleciju 20q (del 20q) pronali smo u 2 od 9 bolesnika s PRV, a oba su bili heterozigoti C/T za navedeni polimorfizam. Analiza kariotipa naših bolesnika pokazuje veliku raznolikost zbog čega nismo mogli pokazati povezanost s ispitivanim polimorfizmom i izvesti relevantne zaključke.

Delecijska mutacija 5 bp gena NBS1 (657del5) pronađena je u ukupno dva ispitanika, i to u skupini oboljelih. Prvi bolesnik bio je dječak koji boluje od MDS, homozigot za mutaciju (657del5/657del5), s tipičnom kliničkom slikom NBS, a drugi ispitanik bila je djevojčica koja boluje od ALL, heterozigot za mutaciju (657del5/N). Varon i suradnici proveli su populacijsku studiju u Njemačkoj, analizirajući povezanost mutiranog alela 657del5 i povećanog rizika razvoja zloćudne bolesti limfatičnog sustava te pronali dva heterozigota za tu mutaciju u skupini od 60 oboljele djece, ali ne i u kontrolnoj skupini (66). U našoj kontrolnoj skupini od 99 ispitanika također nismo pronali heterozigote niti homozigote za mutaciju 657del5 gena NBS1. Učestalost mutacije varira od niske 0,2% do najveće od 1% u različitim slavenskim populacijama (54). Za detaljnije određivanje učestalosti mutacije u zdravoj populaciji Hrvata potrebna je veća skupina ispitanika.

Planirano je istražiti i moguću povezanost genskih promjena polimorfizma C609T gena NQO1 i delecijske mutacije 657del5 gena NBS1, ali zbog malog broja bolesnika s delecijском mutacijom te rezultate nismo mogli analizirati.

Kombinacija genetskih promjena (polimorfizam/mutacija) može povećati sklonost razvoju zloćudnih bolesti i čini kompleksnu osnovu genski uvjetovane karcinogeneze i individualne različitosti bolesnika. Spomenute gene uključili smo u naše istraživanje jer kod obje genske promjene, polimorfizma C609T i delecije 657del5, dolazi do snižene ili nedostatne funkcije njihovih genskih produkata (proteina): enzima kvinon oksidoreduktaza i nibrina. Proteinski produkti oba konstitucijska gena djeluju zaštitno i čuvaju cjelovitost DNA, a time smanjuju mogućnost nastanka kromosomskih aberacija. Enzim kvinon oksidoreduktaza štiti DNA od vanjskih, poglavito kemijskih oštećenja, dok drugi nibrin sudjeluje u popravku već oštećene DNA molekule. U ovom istraživanju 2 bolesnika, koja su bolovala od zloćudne bolesti krvotvornog tkiva u ranoj životnoj dobi, imala su Slavensku mutaciju 657del5 gena NBS1 (jedan homozigot i jedan heterozigot). U tih bolesnika nije nađen polimorfizam C609T gena NQO1, niti promjene u kariotipu, tako da nismo uspjeli pokazati povezanost dvije analizirane genske promjene sa zloćudnom bolesti krvotvornog tkiva. Vjerojatno je za razvoj bolesti bila dovoljna mutacija jednog gena koji sudjeluje u mehanizmu popravka DNA. Važno je naglasiti da se u prisutnosti Slavenske mutacije 657del5 gena NBS1 bolest razvija kronološki rano - u dječjoj dobi.

Snižena ili odsutna aktivnost zaštitnog metaboličkog enzima kvinon oksidoreduktaze učestalija je u skupini ispitanih bolesnika. Moguće je da osobe s polimorfizmom C609T gena NQO1 nemaju uspostavljene alternativne putove zaštite od

djelovanja kemijskih karcinogena, pa razvijaju bolest. Također je moguće pretpostaviti da osobe koje nisu razvile bolest, a nose isti polimorfizam, posjeduju te alternativne putove. Brojni enzimi i njihove varijante sudjeluju u metabolizmu određenog karcinogenog supstrata i stoga polimorfizam C609T genotipa T/T ili C/T gena NQO1 sam ne mora biti dovoljan za zloćudnu preobrazbu. Istraživanje združenih genotipskih promjena koje djeluju na sintezu različitih varijanti raznih enzima uključenih u iste ili alternativne metaboličke putove detoksikacije ili popravka lomova DNA doprinijelo bi boljem razumijevanju povećanog rizika nastanka zloćudne bolesti krvotvornog tkiva. Specifične klonalne promjene na mikroskopskoj (citogenetskoj), submikroskopskoj ili molekularnoj razini nastaju u krvotvornoj matičnoj stanici ili nekoj drugoj progenitorskoj stanici tek u poodmakloj fazi leukomogeneze, a rezultat su nakupljanja naslijeđenih ili stečenih somatskih mutacija u protoonkogenima i tumor-supresorskim genima, uz djelovanje okolišnih čimbenika.

Buduća istraživanja bi mogla otkriti ulogu i drugih gena u održavanju stabilnosti genoma krvotvorne matične stanice, te međudjelovanje tih gena međusobno i s čimbenicima okoliša. To bi pridonijelo razumijevanju razlika između različitih populacija te razjasnilo višestupanjski proces leukemogeneze. Taj proces vjerojatno je u početnoj fazi specifičan za određenu populaciju, s obzirom na zemljopisnu, etničku i kulturološku pripadnost. Premda su bolesti krvotvornih matičnih stanica u svojoj krajnjoj fazi klinički iste u svim populacijama i na isti način se liječe, za poboljšanje preventivnih postupaka trebalo bi im pristupiti uzimajući u obzir populacijsku pripadnost i individualni genotip, upravo zbog mogućeg učinka genotipskog polimorfizma na početni razvoj bolesti.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Ovim istraživanjem dokazali smo da je polimorfizam C609T genotipa T/T i C/T gena NQO1 statistički značajno češće prisutan u skupini bolesnika koji boluju od različitih zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva (39%), nego u skupini zdravih kontrolnih ispitanika (21%) ( $p = 0,031$ ,  $\chi^2$ ). Statistički značajna razlika ( $p = 0,026$ ,  $\chi^2$ ), uz povećan izgled razvoja bolesti (omjer izgleda = 2,4), nađena je u odraslih bolesnika poglavito starije dobne skupine koji boluju od poremećaja mijeloidne loze. Stoga smo zaključili da je navedeni polimorfizam, koji uzrokuje smanjenje ili gubitak funkcije enzima kvinon okidoreduktaze, rizični čimbenik razvoja zloćudne bolesti krvotvornog tkiva u dalmatinskoj populaciji.
2. Uzorci u našem istraživanju kariotipski su vrlo različiti, stoga smo ih razvrstali u skupinu brojčanih, strukturnih ili kombiniranih promjena kromosoma. Brojčane promjene kromosoma u kariotipu imalo je 8 bolesnika, strukturne (poglavito recipročne translokacije kromosoma) 24 bolesnika, dok je kompleksne promjene kariotipa (strukturne i brojčane promjene kromosoma) s više patoloških klonova imalo 9 bolesnika. Analizom klonalnih citogenetskih promjena kariotipa u stanicama koštane srži nismo ustvrdili niti jedan homozigotni polimorfizam C609T genotipa T/T u skupini od 41 bolesnika s klonalnim promjenama, dok su dva bolesnika pokazala homozigotni polimorfizam C609T genotipa T/T u skupini od 36 bolesnika bez klonalnih promjena kariotipa. Analiza kariotipa naših

bolesnika pokazuje veliku raznolikost zbog čega nismo mogli pokazati povezanost s ispitivanim polimorfizmom i izvesti relevantne zaključke.

3. Nadalje smo pokazali prisutnost Slavenske mutacije 657del5 gena NBS1 u dva od 82 uzorka bolesnika. Ovu deleciju mutaciju nismo našli u kontrolnih ispitanika, pa vjerujemo da bi ta mutacija mogla biti važna u leukemogenezi, tim više što se bolest očitovala već u ranoj dobi i to u dječaka (homozigot 657del5/657del5), koji je obolio od MDS, i u djevojčice (heterozigot 657del5/N), koja je obolila od ALL.
4. Zbog malog broja bolesnika sa Slavenskom mutacijom 657del5 gena NBS1, koji uz to nisu imali polimorfizam C609T gena NQO1 niti kromosomske klonalne promjene, nismo mogli analizirati niti ustvrditi važnost združenih (višestrukih) genotipskih promjena u nastanku zloćudne bolesti krvotvornog tkiva. Navedeni pristup vrlo je važan u istraživanju patogeneze zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva, jer često tek niz uzastopnih genskih promjena (oštećenja) uzrokuju klonalno bujanje i razvoj bolesti.

## 7. SAŽETAK

Zloćudne bolesti krvotvornog tkiva su klonalne bolesti koje nastaju zbog genetske promjene u jednoj krvotvornoj stanici koštane srži ili limfatičkog tkiva.

Mehanizam nastanka klonalne promjene nije sasvim razjašnjen, ali se zna da je posljedica zajedničkog djelovanja genetskih i okolišnih čimbenika. Klonalna promjena nastaje kao krajnja posljedica nakupljanja naslijeđenih i stečenih somatskih mutacija u protoonkogenima i tumor-supresorskim genima. Treća skupina gena koja ima ključnu ulogu u patogenezi bolesti su geni za popravak oštećenja DNA, a njihova inaktivacija potiče klonalnu promjenu u smislu preživljenja i bujanja stanica. Produkt gena NQO1 sudjeluje u metaboličkom procesu detoksikacije kemijskih karcinogena, a produkt gena NBS1 sudjeluje u mehanizmu popravka oštećenja DNA, a time zajednički ostvaruju zaštitno djelovanje na stanice krvotvornog sustava.

Istražili smo genske promjene (polimorfizam i deleciju) u dva konstitucijska gena NQO1 i NBS1. Polimorfizam C609T gena NQO1 i deleciju mutaciju 657del5 gena NBS1 istraživali smo u 82 bolesnika koji boluju od različitih zloćudnih bolesti krvotvornog tkiva i 99 zdravih ispitanika standardnim postupcima. Za dokaz polimorfizma C609T proveli smo polimeraznu lančanu reakciju (PCR) i analizu duljine restrikcijskih ulomaka (RFLP) nakon cijepanja enzimom *HinfI* uz vizualizaciju produkata na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu. Za dokaz delecije 657del5 proveli smo postupak PCR i vizualizaciju PCR-produkata na visokorezolucijskom poliakrilamidnom gelu (kako bi razlikovali veličinu produkata od 5 parova baza).

Dokazali smo da je polimorfizam C609T, genotipa T/T i C/T, gena NQO1 statistički značajno češće prisutan u skupini bolesnika (39%) nego u skupini zdravih kontrolnih ispitanika (21%) ( $p = 0,031$ ,  $\chi^2$ ). Statistički značajna razlika uz povećani izgled (rizik) (omjer izgleda = 2,4) razvoja bolesti nađena je u bolesnika starije dobne skupine koji boluju od poremećaja mijeloidne loze ( $p = 0,026$ ,  $\chi^2$ ).

Analizirali smo i klonalne kariotipske promjene u bolesnika s obzirom na zastupljenost polimorfizma C609T gena NQO1. Nismo potvrdili značajnu razliku u zastupljenosti polimorfizma C609T, genotipa T/T ili C/T, gena NQO1 u bolesnika sa specifičnim citogenetskim klonalnim promjenama u kariotipu (41/77) od onih s normalnim kariotipom (36/77).

Nadalje smo pokazali prisutnost Slavenske mutacije 657del5 gena NBS1 u 2 od 82 bolesnika. Ovu deleciju mutaciju nismo našli u kontrolnih ispitanika, pa vjerujemo da bi ta mutacija mogla biti važna u leukemogenezi, tim više što se bolest očitovala već u ranoj dobi i to u dječaka (657del5/657del5), koji je obolio od MDS, i u djevojčice (657del5/N), koja je oboljela od ALL.

Nismo mogli analizirati, niti ustvrditi važnost združenih (višestrukih) genotipskih promjena s nastankom zloćudne bolesti krvotvornog tkiva s obzirom na samo dva bolesnika sa Slavenskom mutacijom 657del5 gena NBS1, koji uz to nisu imali polimorfni genotip C609T (C/T ili T/T) gena NQO1 niti klonalne promjene u kariotipu.

Zaključili smo da obje istraživane genotipske promjene imaju ulogu u patogenezi razvoja zloćudnih klonalnih bolesti krvotvornog tkiva. Buduća istraživanja bi mogla otkriti ulogu i drugih gena u održavanju stabilnosti genoma krvotvorne matične stanice, te međudjelovanje tih gena međusobno i s čimbenicima okoliša.

## **8. SUMMARY**

### **NQO1 AND NBS1 GENE POLYMORPHISMS AS THE RISK FACTORS IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES**

Hematological malignancies are clonal diseases that develop due to the genetic aberration in a single hematopoietic cell in bone marrow or lymphoid tissue.

The mechanism of this clonal aberration is not completely understood, but it is known to be caused by the combined effects of genetic factors and environmental influences. Clonal aberrations are result of the accumulation of inherited and acquired somatic mutations in proto-oncogenes and tumor suppressor genes. The third class of genes is the DNA reparation genes, which inactivation initiates clonal expansion due to the increased cell survival and proliferation. The NQO1 gene product participates in a metabolic process of detoxification of potential chemical carcinogens, whereas the NBS1 gene product participates in DNA reparation, thus both having the protective effects on hematopoietic cells.

In our study we investigated genetic aberrations (polymorphism and deletional mutation) in two constitutional genes, NQO1 and NBS1. We investigated C609T polymorphism of the NQO1 gene and 657del5 mutation of the NBS1 gene in 82 patients with different hematopoietic malignancies and 99 healthy participants using standard methods. For detection of C609T polymorphism, we performed polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) after Hinf1 digestion. The products were visualized on agarose or polyacryamide gels. For detection



of 657del5, we performed PCR with PCR-product visualization of high resolution polyacryamide gel (to distinguish between 5 base pair difference between PCR-products).

We confirmed that the NQO1 gene C609T polymorphism, with T/T and T/C genotypes, significantly more frequent in the patients' group (39%) compared with the healthy participants (21%) ( $p = 0.031$ ,  $\chi^2$ ). The significant difference, with the increased likelihood (risk) (odd ratio = 2.4) of developing hematopoietic malignancy, was found in the group of adult (mostly elderly) patients with myeloid disorders ( $p=0.026$ ,  $\chi^2$ ).

Also, we analyzed clonal karyotype aberrations in patients in relation to the presence of NQO1 gene C609T polymorphism. Nevertheless, we could not confirm the significant difference regarding the frequency of C609T polymorphism, with T/T or C/T genotypes, between patients with the specific cytogenetic clonal aberrations in karyotype (41/77) and those with the normal karyotype (36/77).

Furthermore, we found the presence of the NBS1 gene 657del5 Slavic mutation in 2 out of 82 patients' samples. This deletional mutation was not detected in the control group, therefore we believe that it could be important for leukemogenesis, particularly because disease developed in early age- in a boy (657del5/657del5) with MDS and a girl (657del5/N) with ALL.

We could not analyze and evaluate the importance of the combined (multiple) genotype aberrations for the pathogenesis of hematopoietic malignancies considering only two patients with the NBS1 gene 657del5 Slavic mutation, which was not accompanied neither with the NQO1 gene C609T polymorphism (C/T or T/T) nor with the karyotype clonal aberrations.

Our study revealed that both of the analyzed genotype aberrations have a role in the pathogenesis of hematopoietic clonal malignancies. Further research should reveal the role of other genes in maintaining the stability of the genome of the hematopoietic stem cell, and the interaction of those genes with the environmental factors.

## 9. LITERATURA

1. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J i sur. The WHO classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues. *Hematol J* 2000;1:53-66.
2. Andreis I. Poremećaj sastava i funkcije krvi i krvotvornih organa. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur.,ur. *Patofiziologija*. 5.izd. Zagreb : Medicinska naklada; 2002. str. 722-7.
3. Warmuth M, Danhauser-Riedel S, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies. *Ann Hematol* 1999;78(2):49-64.
4. Pasqualucci L, Liso A, Martelli MP i sur. Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: impact on WHO classification. *Blood* 2006;108(13):4146-55.
5. Martinez-Climent JA. Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. *Leukemia* 1997;11(12):1999-2021.
6. Dewald GW, Morris MA, Lilla VC. Chromosome studies in neoplastic hematologic disorders. U: McClatchez KD, ur. *Clinical Laboratory Medicine*. Baltimore : Williams and Wilkins; 1994. str. 703-40.
7. Mitelman F, Kaneko Y, Berger R. Report of the Committee on Chromosome Changes in neoplasia. U: Cuticchia JA, Pearson PL , ur. *Human Gene Mapping*. Baltimore : Johns University Press; 1994. str. 773-812.
8. Turnpenny P, Ellard S. *Elements of medical genetics*. 12.izd. Edinburg : Elsevier; 2005. str. 203-25.

9. Fearon ER, Burke PJ, Schiffer CA, Zehnbauer BA, Vogelstein B. Differentiation of leukemia cells to polymorphonuclear leucocytes in patient with acute nonlymphoblastic leucemia. *N Engl J Med* 1986;315(1):15-24
10. Krajcinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood* 1999;93(5):1496-501.
11. Sinnett D, Krajcinovic M, Labuda D. Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2000;38 (5–6):447-62.
12. Obe G, Pfeiffer P, Savage JR i sur. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 2002; 504(1-2):17-36.
13. Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 2001;15(17):2177-96.
14. Gollin SM. Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin Cancer Biol* 2005;15(1):33-42.
15. Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY. DNA damage-induced cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 1999;18(55):7883-99.
16. Ferguson DO, Alt FW. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene* 2001;20(40):5572-9.
17. Mühlmann M. Molecular cytogenetics in metaphase and interphase cells for cancer and genetic research, diagnosis and prognosis. Application in tissue sections and cell suspensions. *Genet Mol Res* 2002;1(2):117-27.

18. Sinnett D, Labuda D, Krajinovic M. Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers--the childhood leukemia experience. *Fam Cancer* 2006;5(1):35-47.
19. Tauchi H, Matsuura S, Kobayashi J, Sakamoto S, Komatsu K.. Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability. *Oncogene* 2002;21(58):8967-80.
20. Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271(1):195-204.
21. Ernster B, Navazio F. Soluble diaphorase in animal tissues. *Acta Chem Scand* 1958;12:595-602.
22. Nebert DW, Petersen DD, Fornace AJ Jr. Cellular responses to oxidative stress: the [Ah] gene battery as a paradigm. *Environ Health Perspect* 1990; 88:13-25.
23. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:67-101.
24. Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2000;59(1):65-85.
25. Jaiswal AK, McBride OW, Adesnik M, Nebert DW. Human dioxin-inducible cytosolic NAD(P)H: menadione oxidoreductase. cDNA sequence and localization of gene to chromosome 16. *J Biol Chem* 1988;263(27):13572-8.

26. Jaiswal AK, Bell DW, Radjendirane V, Testa JR. Localization of human NQO1 gene to chromosome 16q22 and NQO2-6p25 and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics* 1999;9(3):413-8.
27. Nebert DW, Roe AL, Vandale SE, Bingham E, Oakley GG. NAD(P)H:quinone oxidoreductase ( NQO1) polymorphism, exposure to benzene, and predisposition to disease: a HuGE review. *Genet Med* 2002;4(2):62-70.
28. Kelsey KT, Ross D, Traver RD i sur. Ethnic variation in the prevalence of a common NAD(P)H:quinone oxidoreductase polymorphism and its implications for anticancer chemotherapy. *Br J Cancer* 1997;76(7):852-4.
29. Ross D, Siegel D, Schattenberg DG, Sun XM, Moran JL. Cell specific activation and detoxification of benzene metabolites in mouse and human bone marrow: identification of target cells and a potential role for modulation of apoptosis in benzene toxicity. *Environ Health Perspect* 1996; 104 Suppl 6: 1177–82.
30. Ross D. Functions and distribution of NQO1 in human bone marrow: potential clues to benzene toxicity. *Chem Biol Interact* 2005;30:153-4:137-46.
31. Siegel D, Ryder J, Ross D. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 expression in human bone marrow endothelial cells. *Toxicol Lett* 2001;125(1-3):93-8.
32. Mohle R, Rafii S, Moore MA. The role of endothelium in the regulation of hematopoietic stem cell migration. *Stem Cells* 1998;16 Suppl 1:159-65.
33. Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L, Shaul Y . Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(3):1188-93.

34. Smith MT. Benzene, NQO1 and genetic susceptibility to cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96(14): 7624–6.
35. Smith MT, Wang Y, Kane E i sur. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. *Blood* 2001;97(5):1422-6.
36. Larson RA, Wang Y, Banerjee M i sur. Prevalence of the inactivating 609C→T polymorphism in the NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood* 1999;94(2):803-7.
37. Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T i sur. Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6(10):4091-5.
38. Wiemels JL, Pagnamenta A, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. *Cancer Res* 1999;59(16):4095-9.
39. Smith MT, Wang Y, Skibola CF i sur. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL translocations in infants and children. *Blood* 2002;100(13): 4590-3.
40. Krajcinovic M, Sinnett H, Richer C, Labuda D and Sinnet D. Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer* 2002;97(2):230-6.

41. Sirma S, Agaoglu L, Yildiz I i sur. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 null genotype is not associated with pediatric de novo acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2004;43(5):568-70.
42. Seedhouse C, Bainton R, Lewis M, Harding A, Russell N, Das-Gupta E. The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia. *Blood* 2002;100(10):3761-6.
43. Blanco G, Edick MJ, Hancock ML, Winick NJ i sur. Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics* 2002;12(8):605-11.
44. Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(25):14960-5.
45. Beall HD, Winski SL. Mechanisms of action of quinone-containing alkylating agents: NAO1-directed drug development. *Front Biosci* 2000;5:D639-48.
46. Sartorelli AC. Therapeutic attack of hypoxic cells of solid tumors: presidential address. *Cancer Res* 1988; 48(4):775-8.
47. Fourie J, Oleschuk CJ, Guziec F Jr. I sur. The effect of functional groups on reduction and activation of quinone bioreductive agents by DT-diaphorase. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002 ;49(2):101-10.
48. The International NBS Study Group. Nijmegen breakage syndrome. *Arch Dis Child* 2000;82(5):400-6.



49. Seemanová E, Jarolím P, Seeman P, Varon R, Sperling K. Zvýšené riziko malignit u heterozygotů v rodinách pacientů s Nijmegen breakage syndromem [An increased cancer risk of heterozygotes in families with Nijmegen breakage syndrome]. *Cas Lékařský Český* 2006;145(2):138-43.
50. Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet* 1997;31:635-62.
51. Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K i sur. Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* 2002;420(6911):93-8.
52. Ranganathan V, Heine WF, Ciccone DN i sur. Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Curr Biol* 2001;11(12):962-6.
53. Saar K, Chrzanowska KH, Stumm M, Jung M i sur.. The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am J Hum Genet* 1997;60(3):605-10.
54. Seemanová E, Jarolim P, Seeman P, Varon R i sur. Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(24):1875-80.
55. Varon R, Vissinga C, Platzer M i sur. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 1998;93(3):467-76.
56. Varon R, Seemanova E, Chrzanowska K i sur. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur J Hum Genet* 2000;8(11):900-2.

57. Iijima K, Komatsu K, Matsuura S, Tauchi H. The Nijmegen breakage syndrome gene and its role in genome stability. *Chromosoma* 2004;113(2):53-61.
58. Tauchi H. Positional cloning and functional analysis of the gene for Nijmegen breakage syndrome, NBS1. *J Radiat Res* 2000;41(1):9-17.
59. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E i sur. The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol* 2000;20(17):6476-82.
60. Seemanova E. An increased risk for malignant neoplasms in heterozygotes for a syndrome of microcephaly, normal intelligence, growth retardation, remarkable facies, immunodeficiency and chromosomal instability. *Mutat Res* 1990;238(3):321-4.
61. Steffen J, Varon R, Mosor M i sur. Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. *Int J Cancer* 2004;111(1):67-71.
62. Steffen J, Maneva G, Popławska L, Varon R, Mioduszevska O, Sperling K. Increased risk of gastrointestinal lymphoma in carriers of the 657del5 NBS1 gene mutation. *Int J Cancer* 2006;119(12):2970-3.
63. Steffen J, Nowakowska D, Niwińska A i sur. Germline mutations 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland. *Int J Cancer* 2006;119(2):472-5.
64. Bogdanova N, Feshchenko S, Schürmann P i sur. Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer. *Int J Cancer* 2008;122(4):802-6.
65. Plisiecka-Halasa J, Dansonka-Mieszkowska A, Rembiszewska A, Bidzinski M, Steffen J, Kupryjanczyk J. Nijmegen breakage syndrome gene alterations and its

- protein (nibrin) expression in human ovarian tumours. *Ann Hum Genet* 2002;66(5-6):353-9.
66. Varon R, Reis A, Henze G, von Einsiedel HG, Sperling K, Seeger K. Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res* 2001; 61(69):3570-2.
67. Chrzanowska KH, Piekutowska-Abramczuk D, Popowska E i sur. Carrier frequency of mutation 657del5 in the NBS1 gene in a population of Polish pediatric patients with sporadic lymphoid malignancies. *Int J Cancer* 2006;118(5):1269-74.
68. Mosor M, Ziółkowska I, Pernak-Schwarz M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Nowak J. Association of the heterozygous germline I171V mutation of the NBS1 gene with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2006;20(8):1454-6.
69. Taylor GM, O'Brien HP, Greaves MF, Ravetto PF, Eden OB. Correspondence re: R. Varon et al. Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2001;61(9):3570-2.
70. Stanulla M, Stumm M, Dieckvoss BO, Seidemann K i sur. No evidence for a major role of heterozygous deletion 657del5 within the NBS1 gene in the pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma of childhood and adolescence. *Br J Haematol* 2000;109(1):117-20.
71. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971;2(7731):971-2.
72. Haranod DG, Klinger HP. An International System for Human Cytogenetics Nomenclature (ISCN). Basel : Karger; 1995.

73. McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR. PCR a practical approach. New York:Oxford University Press; 1991.
74. Seeman P, Gebertová K, Paderová K, Sperling K, Seemanová E. Nijmegen breakage syndrome in 13% of age-matched Czech children with primary microcephaly. *Pediatr Neurol.* 2004;30(3):195-200.
75. Gaedigk A, Tyndale RF, Jurima-Romet M, Sellers EM, Grant DM, Leeder JS. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase: polymorphisms and allele frequencies in Caucasian, Chinese, and Canadian Native Indian and Inuit populations. *Pharmacogenetics* 1998;8(4):305-13.
76. Rosvold EA, McGlynn KA, Lustbader ED, Buetow KH. Identification of an NAD(P)H:quinone oxidoreductase polymorphism and its association with lung cancer and smoking. *Pharmacogenetics* 1995;5(4):199-206.
77. Schulz WA, Krummeck A, Rosinger I, Eickelmann P i sur. Increased frequency of a null-allele for NAD(P)H:quinone oxidoreductase in patients with urological malignancies. *Pharmacogenetics* 1997;7(3):235-9.

## 10. ŽIVOTOPIS

**Bernarda Lozić, dr. med.**

### **Akademski stupanj**

1989. Doktor medicine, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet u Splitu, Split, Republika Hrvatska

### **Sveučilišne edukacije**

1983-1989: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet Split, Split, RH

1992-1993: Poslijediplomski stručni studij medicinske genetike, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet Zagreb

1998-2002: Specijalizacija iz pedijatrije

1999-2000: Poslijediplomski stručni studij Kliničke pedijatrije, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet Zagreb

2002-2003 Poslijediplomski magistarski znanstveni studij "Temeljne i kliničke medicinske znanosti"-smjer Klinička medicina, Medicinski fakultet Split

2007- sada Subspecijalizacija iz Medicinske genetike

### **Klinička edukacija**

1990-1991: Pripravnički staž, KBC Split

1991-1992: Opća praksa, Sinj, RH

1992-1994: Opća praksa, Ministarstvo obrane RH

### **Zaposlenik**

1994- sada KBC Split

**Jezik** Engleski

### **Edukacija molekularno-bioloških tehnika:**

2003-2004: Postdoctoral research fellow at The University of Texas Health Science Centre at San Antonio; USA

2006: Hybride course in genetic counseling in practice; European school of genetic medicine (November 9th-14th); SLOVENIA

2008: Hybrid course in non-invasive prenatal diagnosis (February 24 th -25 th ); CROATIA

**Podaci o sudjelovanju u nastavi:**

- od 2006. god. vježbe i seminari iz izbornih predmeta :

a) Kako nastaju tumori (na prvoj godini studija medicine)

b) Citogenetika tumora [na poslijediplomskom studiju Biologija novotvorina; (voditelj predmeta: prof.dr.sc. Tatijana Zemunik)]

- od 2007. god. vježbe pri kolegiju Pedijatrije (voditelj predmeta: prof.dr.sc.Vjekoslav Krželj)

- od 2008. god. mlađi asistent za predmet Pedijatrija na Medicinskom fakultetu u Splitu

**Popis radova:**

Članci objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Current Contents:

Kuzmanić-Samija R, Resić B, Tomasović M, Gabrić Pandurić D, **Lozić B**, Lozić M, Resić J. West syndrome with periventricular leukomalacia: ten-year clinical study. Coll Antropol 2008; 32 Suppl 1:105-11.

Članci objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Index Medicus, Excerpta Medica:

Čulić V, Balarin L, Zierler H, Sertić J, Čulić S, Rešić B, **Lozić B**, Glamuzina D, Primorac D, Kaliterna M, Tadić T, Janković S, Wagner K. Presentation of two rare mutations in patients with CF. Paediatr Croat 2000;44:161-5.

**Lozić B.** Povezanost genetskih sindroma s malignim bolestima dječje dobi. Paediatr Croat 2006; 50 Supl 1: 249-53.

- Sudjelovanje na brojnim stručnim kongresima u svijetu i kod nas iz područja medicinske genetike, a što potvrđuje 26 sažetaka objavljenih u časopisima koji se indeksiraju u Indeks Medicus/Excerpta Medica.