

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Biologie
Buněčná a vývojová biologie



Bc. Michal Kroupa

Chromozomální poškození a kapacita opravy DNA v periferních lymfocytech jako ukazatelé
karcinogeneze

Chromosomal damage and DNA repair capacity in blood lymphocytes as transient markers in
carcinogenesis

Diplomová práce

Školitel: MUDr. Pavel Vodička, CSc.

Praha, 2013

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29. 4. 2013

.....
Michal Kroupa

Poděkování

Poděkování patří především RNDr. Zdeně Polívkové za přístup, velkou trpělivost, věnovaný čas a odborné vedení, které mi poskytla v průběhu laboratorní práce. Děkuji dále svému školiteli MUDr. Pavlu Vodičkovi, CSc. za cenné rady a především za možnost vypracování diplomové práce na Oddělení molekulární biologie nádorů ÚEM AV ČR. Dále bych rád poděkoval Věře Filipiové z Ústavu obecné biologie a genetiky 3. LF UK, MUDr. Ludmile Vodičkové CSc., Mgr. Janě Slyškové, PhD, Ing. Veronice Polákové-Vymetálkové, PhD, Mgr. Soně Vodenkové, Mgr. Kateřině Jiráskové a dalším spolupracovníkům z Oddělení molekulární biologie nádorů ÚEM AV ČR. Děkuji také RNDr. Věře Nedomové z Centra lékařské genetiky a reprodukční medicíny v Praze a Pavlu Křížovi z Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Děkuji dále MUDr. Michaele Schneiderové z Chirurgické kliniky Všeobecné fakultní nemocnice a MUDr. Karlu Veškrňovi z Fakultní Thomayerovy nemocnice v Praze. Rád bych poděkoval také své rodině a přítelkyni za podporu a zázemí v průběhu studia.

Abstrakt

V současné době je známo, že působení faktorů vnějšího i vnitřního prostředí buňky společně s genovými variantami modulují riziko rozvoje sporadických forem nádorů. Strukturní chromozomální aberace v periferních lymfocytech představují biomarker působení genotoxických karcinogenů a jsou považovány za indikátor zvýšeného rizika rozvoje nádorového bujení. Hlavní příčinou vzniku chromozomálních aberací jsou neopravené či chybně opravené dvouvláknové zlomy v molekule DNA; cytogenetickým měřením těchto alterací lze získat představu o tzv. „interindividuální variabilitě“ v odpovědi na mutagen. Předpokládané deficiencie v kapacitě opravy DNA byly v této práci zkoumány u incidentních onkologických pacientů s nádory prsu, tlustého střeva a konečníku a u pacientů s nádory urogenitálního systému. Stanovení chromozomálního poškození bylo doplněno o analýzu vybraných genových variant genů účastnících se opravy poškozené DNA (XRCC3, rs861539; RAD54L, rs1048771). V této studii byla využita konvenční cytogenetická analýza a cytogenetická analýza založená na indukci chromozomálních aberací bleomycinem (tzv. „Challenge assay“), diskriminační analýza TaqMan pro stanovení alelických variant a statistická analýza. Výše uvedenými metodami nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v průměrné hladině chromatidových zlomů ($p=0,354$) ani v průměrném procentu buněk s chromatidovými zlomy ($p=0,332$) u incidentních onkologických pacientů v porovnání se zdravými osobami po ovlivnění buněk bleomycinem. Tyto parametry nebyly zároveň statisticky významně ovlivněny kouřením, diagnózou pacientů, věkem a pohlavím u obou skupin - pacientů a zdravých osob. Podařilo se nám prokázat interindividuální variabilitu v odpovědi na působení bleomycinu jak u pacientů, tak i u zdravých osob. Rozložení pacientů a zdravých osob do skupin na základě citlivosti k působení bleomycinu však neprokázalo významný rozdíl. Hladina chromatidových zlomů po působení bleomycinu nebyla modulována variantní alelou genu XRCC3 (rs861539; $p=0,310$) ani genu RAD54L (rs1048771; $p=0,394$). Z našich výsledků lze říci, že hladinu chromatidových zlomů a průměrné procento aberantních buněk s chromatidovými zlomy po expozici buněk bleomycinu nelze považovat za prediktivní biomarker rizika rozvoje nádorového bujení a to zejména v malých a heterogenních studiích. Námi vybrané genové varianty genů zahrnutých při opravě poškození DNA dle našich výsledků neovlivňují míru chromozomálního poškození.

Klíčová slova

Aberace chromozómů, chromatidové zlomy, test indukce aberací bleomycinem, interindividuální variabilita, odpověď na poškození DNA, genové polymorfismy, XRCC3, RAD54L, biomarker, karcinom prsu (BRCA), karcinom tlustého střeva a konečníku (CRC), dvouvláknové zlomy DNA, homologní rekombinace.

Abstract

Recent knowledge suggests that the onset of cancer is modulated by the interplay of internal and external environmental factors along with numerous gene variants. Structural chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes are considered as biomarkers of effect of genotoxic carcinogens and reflect elevated risk of cancer. Incomplete or deficient repair of double-strand breaks in DNA underlie chromosomal aberrations and the measurement of cytogenetic alterations may reflect interindividual differences in the response towards the mutagen. In this study the expected deficiencies in the DNA repair capacity have been determined in incident oncological patients with breast, colorectal and urogenital cancers. The determination of chromosomal aberrations have been supplemented by the measurement of variants in genes involved in double-strand breaks repair (XRCC3, rs861539; RAD54L, rs1048771). Methodologically, we employed conventional cytogenetic analysis, cytogenetic analysis following the induction of chromosomal damage by bleomycin („Challenge assay“), TaqMan discrimination analysis for the detection of allelic variants and statistical analyses. By using these methods we did not observe statistically significant differences either in chromosomal breaks ($p=0,354$) or in a percentage of cells with chromatid breaks ($p=0,332$) in incident oncological patients compared to control subjects following the bleomycin treatment. Above cytogenetic parameters were not significantly affected by confounders, such as smoking, age, gender or diagnosis, either in a group of patients or in controls. We observed considerable interindividual variability in a response towards bleomycin challenge in both investigated groups. However, the stratification of subjects into the categories according to the sensitivity towards bleomycin did not show any significant difference between the patients and the controls. Bleomycin-induced chromatid breaks were not modified by variant alleles either in XRCC3 (rs861539; $p=0,310$) or RAD54L (rs1048771; $p=0,394$) genes. Our results suggest that frequencies of chromatid breaks and the percentage of aberrant cells with chromatid breaks may not serve as the only predictive marker for cancer onset, particularly in limited and heterogeneous studies. In our hands, variants in genes involved double-strand break repair pathway were not associated with the extent of chromosomal damage.

Keywords

Aberrations of chromosomes, chromatid breaks, bleomycin, interindividual variability, DNA damage response (DDR), gene polymorphisms, XRCC3, RAD54L genes, biomarker, breast cancer (BRCA), colorectal cancer (CRC), DNA double-strand breaks, homologous recombination.

Obsah

Seznam zkratk relevantních genů a proteinů	8
Seznam obecných použitých zkratk	8
1. ÚVOD	9
2. STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1. Četnost výskytu nádorových onemocnění	10
2.2. Stárnutí populace a incidence nádorových onemocnění	12
2.3. Biologická podstata nádorových onemocnění	13
2.3.1. Úloha zevních faktorů při vzniku nádorových onemocnění	14
2.3.2. Genetické faktory vzniku nádorových onemocnění	14
2.3.2.1. Protoonkogeny a nádorové supresorové geny	15
2.3.2.2. Epigenetické změny	17
2.3.3. Integrita genomu a nádorová onemocnění	17
2.4. Poškození DNA a jeho oprava	18
2.4.1. Odpověď na poškození DNA	20
2.4.1.1. Oprava dvouvláknových zlomů DNA	21
2.4.1.1.1. Nehomologní spojování konců	21
2.4.1.1.2. Homologní rekombinace	22
2.4.2. Polymorfismy v genech zodpovědných za reparaci poškození DNA	24
2.5. Biomarkery	25
2.5.1. Typy biomarkerů	26
2.5.1.1. Mikrojádra	26
2.5.1.2. Sesterské chromatidové výměny	26
2.5.1.3. Strukturální chromozomální aberace	27
2.5.1.3.1. Historie studia mechanismů vzniku chromozomálních aberací	28
2.5.1.3.2. Chromatidové vs. chromozómové aberace	29
2.5.1.3.3. Chromozomální aberace a nádorová onemocnění	29
2.5.2. Test indukce aberací bleomycinem, tzv. "Challenge assay"	30
3. CÍLE PROJEKTU	32
4. MATERIÁL	33
4.1. Vyšetřované osoby	33
4.2. Chemikálie a spotřební materiál	34
4.2.1. Potřeby pro kultivaci a cytogenetické zpracování lymfocytů	34
4.2.2. Potřeby pro izolaci DNA z periferní krve	34
4.2.3. Potřeby pro alelickou diskriminační analýzu	35

5. METODIKA	36
5.1. Test senzitivity k bleomycinu	36
5.1.1. Kultivace lidských periferních lymfocytů.....	36
5.1.2. Příprava cytogenetických preparátů	36
5.1.3. Hodnocení cytogenetických preparátů	37
5.2. Stanovení polymorfismů	42
5.2.1. Izolace DNA z periferní krve	42
5.2.2. Alelická diskriminační analýza	44
5.2.3. Statistické hodnocení	48
6. VÝSLEDKY	49
6.1. Test indukce aberací bleomycinem	49
6.1.1. Souhrnné výsledky cytogenetického hodnocení	49
6.1.2. Statistické porovnání aberantních buněk v jednotlivých skupinách	51
6.1.3. Statistické porovnání hladiny zlomů v jednotlivých skupinách	56
6.2. Pilotní stanovení polymorfismů v genech opravy dvouvláknových zlomů DNA	60
7. DISKUZE	68
8. ZÁVĚRY	74
Seznam použité literatury	75
Příloha	86

Seznam zkratk relevantních genů a proteinů

APC	adenomatous polyposis coli
ATM	ataxia telangiectasia mutated
BRCA (1, 2, 3)	breast cancer genes (1, 2, 3)
CCND1	cyclin D1
CIP1	cyclin inhibitor protein 1
DCC	deleted in colorectal carcinoma
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
H2AX, gammaH2AX	histone 2AX, phospho-histone 2AX
H-RAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
K-RAS(2)	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (2)
Ku70/80	X-ray repair cross-complementing 5
MLH1	mutL homolog 1
MRE11	meiotic recombination 11
MSH (2, 3, 6)	mutS homolog 2, 3, 6
MYC	myelocytomatosis viral oncogene
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NBS1	Nijmegen breakage syndrome (Nibrin)
PARP-1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PMS1, PMS2	postmeiotic segregation increased 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAD (50,51,54L)	Radiation sensitive (50,51,54-like)
RB1	retinoblastoma 1
RPA	Replication protein A
SMAD4	SMAD family member 4
TP53	tumor protein p53
XRCC(2,3,4)	X-ray repair cross-complementing (2,3,4)

Seznam obecných použitých zkratk

BER	base excision repair	bázově excizní oprava
BLM	bleomycin	bleomycin
BRCA	breast cancer	nádorové onemocnění prsu
CRC	colorectal cancer	karcinom tlustého střeva a konečníku
CHT	chromatid	chromatidové
CHA	chromosomal aberrations	chromozomální aberace
CHSA	chromosome aberrations	chromozómové aberace
CHTA	chromatid aberrations	chromatidové aberace
DG	diagnosis	diagnóza
HR	homologous recombination	homologní rekombinace
NER	nucleotide excision repair	nukleotidová excizní oprava
NHEJ	nonhomologous end joining	nehomologní spojování konců
PBL	peripheral blood lymphocytes	lymfocyty periferní krve
UGC	urogenital and gynaecological tumors	urogenitální a gynekologické nádory

1. ÚVOD

Nádory představují relativně rozsáhlou rodinu komplexních onemocnění, která nemají jedinou příčinu. Na jejich vzniku se významně podílejí genetické změny, tj. mutace genů zodpovědných za regulaci buněčného dělení, stabilitu genomu, apoptózu, angiogenezi, invazivitu a schopnost metastazovat. Důležitou úlohu hrají také epigenetické modifikace regulující exprese těchto genů. Na buněčné a molekulární úrovni představuje nádorové bujení nekoordinovaný růst tkáně autonomní povahy, který je zapříčiněn deregulací rovnováhy mezi buněčnou proliferací a apoptózou. Celý vícestupňový proces neoplastické transformace může nakonec vyústit v pomnožení mutantních buněčných klonů, které pronikají do okolní tkáně a prostřednictvím krevního a lymfatického systému invadují do celého těla, kde tvoří metastázy.

Nádory se mohou fenotypicky lišit v rychlosti růstu, schopnosti metastazovat, v odpovědi na léčbu nebo v prognóze vývoje onemocnění. Jejich společnou vlastností je však narušení genomové stability, které je přímým důsledkem neopraveného nebo chybně opraveného poškození DNA (Romney *et al.*, 2001, Shen Z, 2011). Genomová nestabilita se může manifestovat jako mutace na úrovni nukleotidů nebo může být pozorována mikroskopem v podobě rozsáhlých strukturních i numerických chromozomálních změn (např. chromatidové zlomy, dicentrické chromozómy a další aberace chromozómů, mikrojádra, sesterské chromatidové výměny). Tyto znaky narušení biologických procesů souhrnně označujeme jako biomarkery, přičemž jejich vhodným výběrem lze získat představu o schopnosti jedince opravovat poškození DNA. Zjištění reparační kapacity DNA pomocí funkčních testů představuje integrální pohled, zahrnující úlohu genových variant, epigenetických změn genové exprese (Naccarati *et al.*, 2012a, Slysokva *et al.*, 2012b), stabilitu genových produktů a interakci s faktory životního stylu a prostředí.

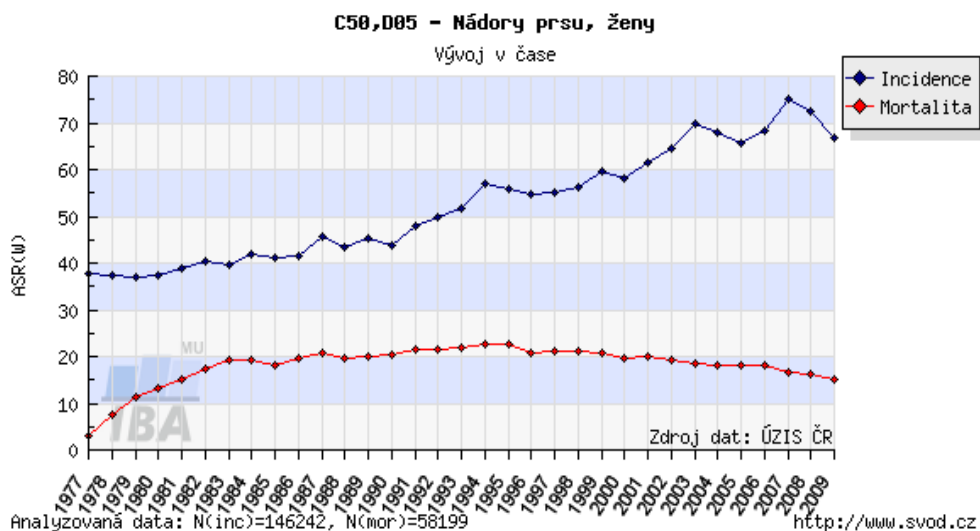
Studium podstaty nádorového bujení a chování nádorových buněk je důležité pro prevenci této skupiny závažných onemocnění a má přispět k vývoji nových způsobů cílené léčby.

2. STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. Četnost výskytu nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění jsou v současné době po kardiovaskulárních chorobách celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí. Přibližně každé čtyři vteřiny zemře jeden člověk na následky spojené s touto nemocí. Podle databáze Globocan byl v roce 2008 počet nových případů na celém světě 12,7 milionu a 7,6 milionu lidí zemřelo (www.globocan.iarc.fr, 2013).

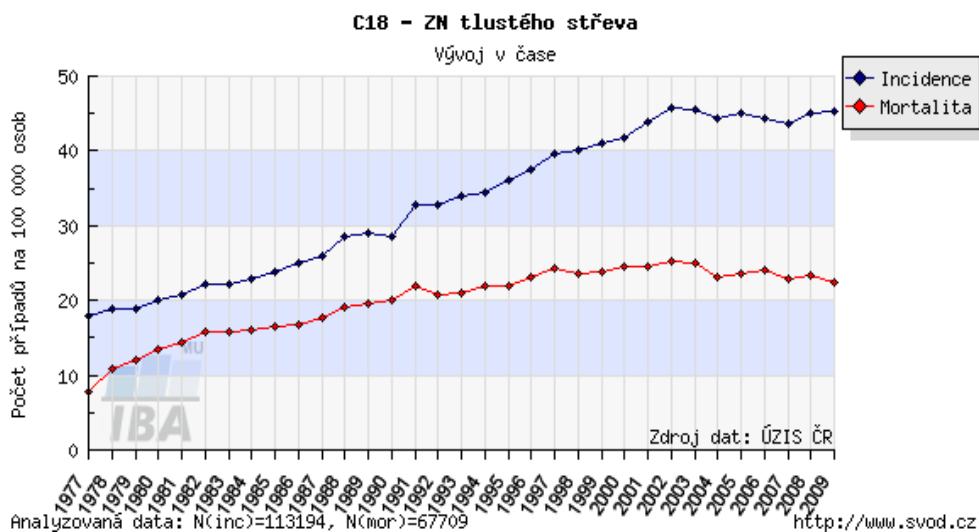
Prim v celosvětové incidenci nádorových onemocnění u žen si drží rakovina prsu (breast cancer, BRCA). Počet nových případů BRCA ročně atakuje hranici 1,4 milionu. Poměr incidence a mortality (přibližně 3:1) sice není tak výrazný jako u nádorového onemocnění plic (téměř 1:0,9), ale i přesto je úmrtnost na následky spojené s BRCA nejčastější příčinou smrti u žen na nádorová onemocnění ve světě (459 000 úmrtí ročně; www.globocan.iarc.fr, 2013). Převažující podíl incidence představuje sporadická forma BRCA, přičemž dědičné faktory hrají důležitou úlohu u 5-10% všech nových případů. V etiologii BRCA se významně podílejí mutace klíčových genů, věk, obezita a hormonální změny v průběhu klimakteria. BRCA je druhým nejčastějším typem nádorového onemocnění v České republice. Každý rok v ČR zemře na následky této nemoci přibližně 1600 lidí (www.svod.cz, 2011), což odpovídá počtu obyvatel města Harrachov. Ve valné většině případů se jedná o ženy, protože BRCA u mužů je poměrně vzácné a téměř výlučně familiární onemocnění tvořící necelé 1% z celkového počtu případů (Chavez-Macgregor *et al.*, 2013). Do této diplomové práce byl zařazen i výjimečný případ BRCA u muže bez předchozího výskytu nemoci v rodině.



Obr. 1: Incidence a mortalita BRCA u žen v ČR.

Je patrné, že incidence BRCA v ČR za uplynulých dvacet let stále narůstá, přičemž mortalita se pohybuje na stabilní úrovni. V průběhu posledních let mortalita dokonce mírně klesá díky pokročilejším diagnostickým metodám a léčebným postupům (převzato z: www.svod.cz, 2011).

Velmi časté jsou také nádory postihující trávicí trubici a zažívací orgány. Především jde o nádorová onemocnění žaludku (737 000), jater (696 000) a o karcinom tlustého střeva a konečníku (colorectal cancer, CRC; 609 000); uvedená čísla v závorkách představují celosvětovou roční mortalitu. CRC globálně ročně postihuje více než 1,2 milionu lidí obou pohlaví. Poměr incidence a mortality činí 2:1, přičemž úmrtnost ještě převyšuje míru úmrtnosti BRCA (www.globocan.iarc.fr, 2013). CRC je třetím nejrozšířenějším nádorovým onemocněním v ČR, na jehož následky ročně umírá přibližně 4000 lidí. Celosvětové prvenství, kterým se rozhodně nelze chlubit, zaujímá ČR v incidenci nádorů konečníku (Konecny *et al.*, 2008). Zvýšená incidence CRC byla zaznamenána především ve střední Evropě v průběhu posledních dvou desetiletí. Příčinou rapidního nárůstu nových případů může být souhra působení mnoha faktorů. Strava s nadbytkem masa a nedostatkem vlákniny v kombinaci s působením vrozených dispozic mají důležitou roli při rozvoji CRC. Rizikovým faktorem je vedle obezity a diabetu také výskyt střevních polypů (juvenilní polypóza, familiární adenomatózní polypóza), které se často tvoří v tlustém střevě u osob středního věku (Tanaka, 2009). Některé z nich mohou působením faktorů vnějšího prostředí zmalignizovat (Huxley *et al.*, 2009, Joshi *et al.*, 2009, Huhn *et al.*, 2012). Preventivní screeningové programy jsou proto zaměřeny především na osoby staršího a středního věku.



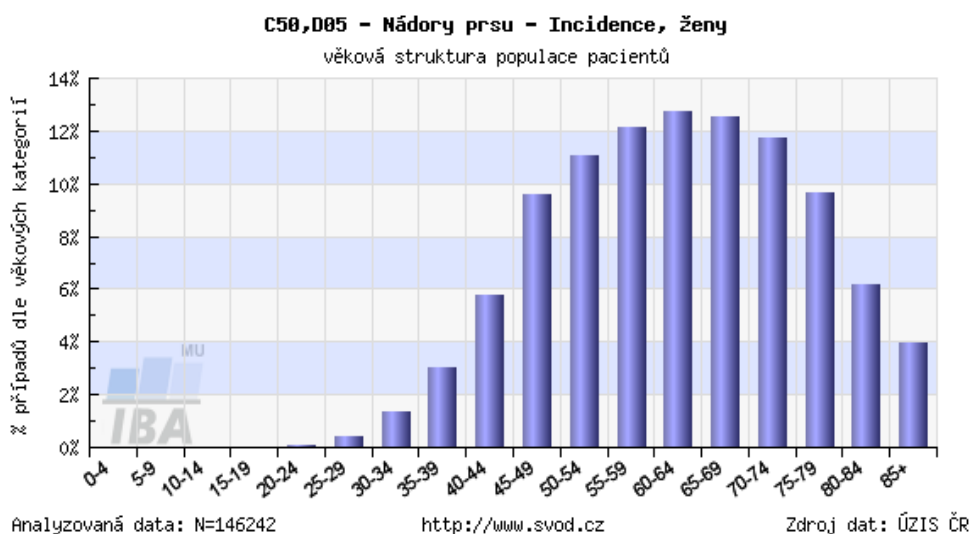
Obr. 2: Incidence a mortalita CRC u obou pohlaví v ČR.

Obr. 2 popisuje incidenci a mortalitu spojenou s CRC v ČR s patrným nárůstem nových případů v průběhu uplynulých třiceti let (převzato z: www.svod.cz, 2011).

V této práci jsou studovány kromě BRCA a CRC také gynekologické nádory a nádorová onemocnění urogenitálního systému (urogenital and gynaecological tumors, UGC), která patří podle epidemiologických, populačních a demografických dat mezi velmi častá. Celosvětová incidence nádorů předstojné žlázy (899 000 nových případů ročně; www.globocan.iarc.fr, 2013) sice velmi výrazně narostla za uplynulých třicet let, avšak tento trend je silně ovlivněn pokrokem v diagnostických metodách. Proto není uveden graf závislosti incidence a mortality jako u BRCA a CRC.

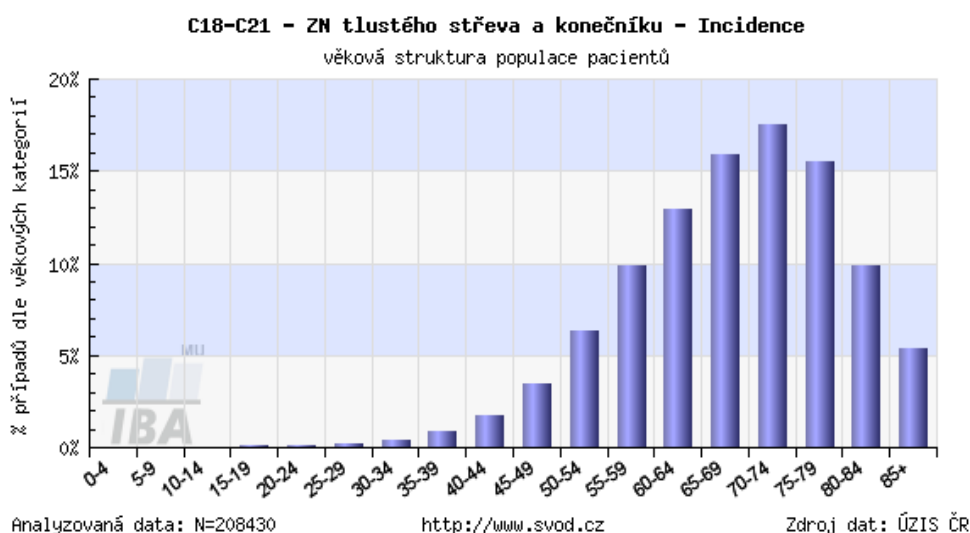
2.2. Stárnutí populace a incidence nádorových onemocnění

Věk hraje důležitou roli při vzniku většiny solidních nádorů. Lze konstatovat, že majoritní podíl nádorových onemocnění je přímým důsledkem stárnutí. Je to proto, že v průběhu života dochází k akumulaci mutací v somatických buňkách a ke změnám v genové expresi, způsobené nejen mutacemi, ale i změnami v metylaci DNA, jež také provázejí stárnutí. Rovněž schopnost opravy poškození DNA se mění s věkem (Hoeijmakers, 2009). Jako příklad uvádím vztah incidence BRCA a CRC na věku v naší populaci (*Obr. 3 a 4*).



Obr. 3: Incidence BRCA u žen v ČR.

Z obr. 3 plyne, že četnost výskytu BRCA prudce roste po 40. roce věku jedince. Tento nárůst kromě věku také úzce souvisí s hormonálními změnami během klimakteria (převzato z: www.svod.cz, 2011).



Obr. 4: Incidence CRC u obou pohlaví v závislosti na věku české populace.

Z obr. 4 je patrné, že CRC postihují pacienty v produktivním věku a výrazně narůstají ve stáří (převzato z: www.svod.cz, 2011).

Světová populace stále roste. Podle dostupných odhadů bude v roce 2030 činit 8,3 miliardy lidí. Její věkové složení bude však od současného stavu pravděpodobně odlišné. Proto lze předpokládat enormní nárůst nově diagnostikovaných různých typů nádorových onemocnění. Tento předpoklad bude s vysokou pravděpodobností umocněn také pokrokem v diagnostických metodách. Ze studie Mezinárodní agentury pro výzkum nádorových onemocnění (International Agency for Research on Cancer, IARC) a Americké společnosti pro nádorová onemocnění (American Cancer Society, ACS) vyplývá, že incidence nádorů se může v následujících dvou desetiletích celosvětově zvýšit až o 75%. Odhad souvisí se zlepšující se zdravotní péčí v nejhudších zemích světa. Dalším aspektem ve prospěch incidence novotvarů je možná stabilizace šíření nemocí jako jsou AIDS a ostatních globálně rozšířených smrtelných onemocnění. Lidé v rozvojových zemích budou pravděpodobně žít dostatečně dlouho na to, aby u nich mohlo dojít k rozvoji nádorových onemocnění, což rovněž přispěje k počtu nově diagnostikovaných případů (Bray *et al.*, 2012).

Lékařské, společenské a etické důsledky nádorových onemocnění jsou zřejmé. Jsou tím závažnější, že nejčastější typy nádorů postihují pacienty ještě v produktivním věku (Dusek *et al.*, 2012). Je tudíž pochopitelné, že výzkum nádorového bujení stojí v popředí zájmu současného vědeckého výzkumu. Paradoxně je tak o fyziologii nádorových buněk známo více než o chování buněk zdravých.

2.3. Biologická podstata nádorových onemocnění

Neoplastická transformace je proces, při kterém dojde k přeměně jedné aberantní buňky v maligní buněčnou populaci. Pouze malé procento nádorů je výhradně dědičných, naprostá většina je sporadická a nádorová buněčná transformace je výsledkem interakce mezi vrozenými predispozicemi jedince a působením faktorů vnějšího prostředí (Tomlinson *et al.*, 2010).

Rozšíření poznatků o vzniku nádorových onemocnění je významným předpokladem pro dlouhodobé snížení počtu nově diagnostikovaných nádorů. Současné znalosti o vzniku nádorových onemocnění jsou relativně rozsáhlé a je důležité informovat veřejnost o prokázaných rizikových faktorech, které mohou vést k jejich rozvoji. Téměř jedné třetině úmrtí spojených s nádory je možno předejít patřičnou prevencí. Je dobře známo, že zachycení časného stádia rozvoje nádorového onemocnění může významně ovlivnit prognózu pacienta a jeho léčitelnost (Tab. 1).

Diagnostická skupina		Stadium I			Stadium II		
		N	5leté relativní přežití (%)	95% IS	N	5leté relativní přežití (%)	95% IS
C61	Předstojná žláza - prostata	2 778	97,9	91,4-100,0	13 365	99,3	96,5-100,0
C62	Varle	3 720	99,0	97,0-100,0	1 133	96,4	89,9-99,2
C64-C66,C68	Ledvina a jiné org. močových cest	7 399	94,1	90,8-97,0	5 630	84,7	78,9-89,7
C67	Močový měchýř	9 831	90,3	86,9-93,4	2 980	61,0	54,3-67,2
Diagnostická skupina		Stadium III			Stadium IV		
		N	5leté relativní přežití (%)	95% IS	N	5leté relativní přežití (%)	95% IS
C61	Předstojná žláza - prostata	3 501	87,7	81,9-92,7	3 800	39,3	34,5-44,3
C62	Varle	664	74,3	65,6-80,5	*	*	*
C64-C66,C68	Ledvina a jiné org. močových cest	2 989	66,4	58,7-73,4	1 979	17,0	12,8-21,9
C67	Močový měchýř	720	36,7	26,6-46,8	712	15,6	9,2-23,9

Tab. 1: pětileté relativní přežití u léčených onkologických pacientů s vybranou diagnózou v ČR dle klinických stadií, analýza období 2005–2008 (převzato z: Pavlik *et al.*, 2011).

2.3.1. Úloha zevních faktorů při vzniku nádorových onemocnění

Zevní prostředí může obsahovat řadu karcinogenních faktorů fyzikální, chemické nebo biologické povahy. Mezi fyzikální karcinogeny lze zařadit ionizující a UV záření. Nejznámější chemické karcinogeny jsou např. azbest, polycyklické aromatické uhlovodíky a další chemické látky přítomné např. v tabákovém kouři, mykotoxin aflatoxin, heterocyklické aminy, nitrosaminy, formaldehyd a benzen. Zdrojem chemických karcinogenů v našem životním prostředí jsou zplodiny průmyslových výroby, zemědělství (pesticidy, hnojiva), spalování fosilních paliv a odpadů, emise spalovacích motorů. Poslední skupinou jsou biologické karcinogeny, kam patří některé viry se schopností integrovat svoji nukleovou kyselinu do genomu hostitelské buňky (např. lidské Papillomaviry, původce karcinomu děložního hrdla; Wogan *et al.*, 2004, www.who.int, 2013). Mnoho mutagenů a karcinogenů vzniká i při nevhodné tepelné úpravě potravin, při jejich skladování či kontaminaci.

2.3.2. Genetické faktory vzniku nádorových onemocnění

I když všechna nádorová onemocnění mají určitý genetický podklad, je jen malá část těch, která jsou výhradně dědičná. Je dobře známa celá řada dědičných nádorových syndromů, kdy jsou z rodičů na potomky přenašeny genetické předpoklady k rozvoji nádoru (Talseth-Palmer *et al.*, 2013). U takto postižených jedinců nesou všechny zárodečné i somatické buňky mutace v určitých genech, které mohou představovat riziko pro rozvoj malignit.

Převážná většina nádorových onemocnění je ale sporadická. V takovém případě dochází k akumulaci mutací v genech spojených s nádory až v průběhu života jedince. Tyto mutace jsou v současné době dobře popsány, i když výčet zahrnutých genů není zdaleka kompletní. Jde o narušení funkce protoonkogenů či nádorových supresorových genů, jejichž klíčovou rolí je regulace buněčného dělení (Naccarati *et al.*, 2012b, Weinstein a Joe, 2006).

2.3.2.1. Protoonkogeny a nádorové supresorové geny

Pro normální vývoj a funkci různých tkání i orgánů plní protoonkogeny nezastupitelnou úlohu. Protoonkogeny kódují proteiny, důležité pro stimulaci a kontrolu průběhu buněčného cyklu. Jejich produkty jsou růstové faktory, receptory růstových faktorů, signální molekuly a signál přenášející molekuly, aktivátory transkripce a replikace. Jejich genetická změna mutací, chromozomální translokací nebo amplifikací, či epigenetické ovlivnění exprese těchto genů vede k nadměrné nebo stálé aktivitě jejich produktů. V takovém případě se z protoonkogenu stává onkogen a dojde k zvýšené stimulaci buněčného dělení. Zároveň je inhibována buněčná smrt, což je jeden z typických znaků nádorových buněk. Geny homologní buněčným protoonkogenům jsou nacházeny též u některých retrovirů, schopných vyvolat nádory u různých živočišných druhů. Mezi důležité onkogeny patří např: cyklin D1, c-myc, abl/bcr, H-ras, K-ras, N-ras, ERB, Her-2/neu, β -Catenin a další (Pierotti *et al.*, 2000, <http://www.cancerquest.org/oncogene-table.html>).

Naopak funkcí nádorových supresorových genů je potlačení buněčného dělení a stimulace buněčné smrti. Některé z těchto genů jsou zahrnuty i při opravě poškození DNA, čímž zabráňují hromadění mutací. Avšak stejně jako všechny ostatní geny, i nádorové supresorové geny podléhají mutacím. Na rozdíl od protoonkogenů vyžadují nádorové supresorové geny pro ztrátu své funkce mutaci (nebo delecii a mutaci) v obou alelách (Knudson, 1971). Manifestace mutací nádorových supresorových genů má proto recesivní charakter. Některé dědičné nádory jsou způsobeny přítomností jedné mutované alely nádorového supresorového genu ve všech somatických buňkách a v buňce, ve které dojde ke ztrátě heterozygoty mutací i druhé alely je zahájen nádorový proces. Příkladem takového dědičného nádoru je retinoblastom, který má ale i sporadickou formu. Mezi nádorové supresorové geny patří např. RB1, ATM, TP53, APC, MLH1, MSH2, MSH6, BRCA1 a BRCA2 (Giono a Manfredi, 2006, Aoki a Taketo, 2007, Greenberg, 2008, <http://www.cancerquest.org/tumor-suppressors-table.html>).

V následující tabulce (*Tab. 2*) jsou popsány funkce některých nádorových supresorových genů a protoonkogenů v souvislosti s rizikem rozvoje BRCA a CRC (de Miranda *et al.*, 2012; sestaveno dle: <http://atlasgeneticsoncology.org>, 2011):

Geny často mutované při rozvoji CRC	
Gen	Funkce
APC	nádorový supresorový gen, obě alely jsou mutovány v přibližně 80% případů sporadických CRC. Jeho produkt hraje důležitou roli při buněčné adhezi, v průběhu apoptózy, segregaci chromozómů a buněčné migraci.
MLH1, MSH2	geny „mismatch“ reparace (oprava chyb vzniklých při replikaci), mutace asociovány s dědičnou formou nepolypózního CRC.
KRAS2	protein zahrnutý v transdukci růstové signalizace, je mutován přibližně ve 40% případů CRC.
DCC	protein DCC je receptor pro inhibitor apoptózy, delece popsána u 75% případů CRC.
SMAD4	nádorový supresorový protein, účastní se TGF- β signalizace, delece asociovány s CRC.

Geny často mutované u BRCA	
Gen	Funkce
BRCA1	pravděpodobně nádorový supresorový protein, transkripční faktor, účastní se opravy dvouvláknových zlomů DNA, role v proliferaci buněk mléčné žlázy.
BRCA2	nádorový supresorový protein, účastní se opravy dvouvláknových zlomů DNA, vrozené mutace asociovány s vysokou pravděpodobností rozvoje BRCA (u obou pohlaví).
BRCA3	vrozené mutace pravděpodobně souvisí s predispozicí k BRCA.
ATM	kóduje kinázu ATM, důležitá role při odpovědi na poškození DNA, posttranslačně modifikuje oblast narušeného chromatinu a reparační proteiny, mutace vedou k vysoké citlivosti k ionizujícímu záření a predispozici ke vzniku nádorového bujení.
ERBB2	kóduje protein HER2/neu, nadměrně exprimován v přibližně 1/4 případů BRCA, HER2/neu je důležitým biomarkerem BRCA.
CCND1	produkt genu je důležitý při regulaci G1 fáze buněčného cyklu, nadměrná exprese vede ke zvýšené genomové nestabilitě a možnému vzniku mutovaných buněčných klonů.
FGFR1	produkt genu je receptorem pro růstové faktory, často nadměrně exprimován společně s CCND1 u různých typů nádorového bujení.
HRAS, KRAS, NRAS	patří do superrodiny proteinů RAS/RHO/RAB, role při regulaci buněčné proliferace, mutace popsány v malém množství případů BRCA (10%).

Společné geny, které jsou často mutované při rozvoji CRC a BRCA	
Gen	Funkce
TP53	kóduje nádorový supresorový protein p53, p53 je transkripční faktor, spouští přepis inhibitorů buněčné proliferace, důležitá role při odpovědi na poškození DNA, aktivaci reparace a eventuálně apoptózy, mutován v přibližně 50% případů CRC a 25% případů BRCA.
PTEN	nádorový supresorový protein, mutace vedou k absenci proteinů MLH1-MSH2 a ke vzniku dědičné formy nepolypózního CRC.
MSH2, MSH3, MLH1	geny zahrnuté v opravě chybného párování bází (mismatch repair, MMR), mutace vedou ke genomové nestabilitě.

Tab. 2: Funkce vybraných nádorových supresorových genů a protoonkogenů v souvislosti s rizikem rozvoje BRCA a CRC.

2.3.2.2. Epigenetické změny

Ačkoli abnormality na úrovni nukleotidů (genové mutace) a na úrovni chromozómů (chromozomální aberace, CHA) byly po mnoho let považovány za hlavní faktory při iniciaci a progresi nádorového bujení, v současné době je známo, že i epigenetické faktory hrají klíčovou úlohu v průběhu těchto procesů (Sandoval *et al.*, 2011).

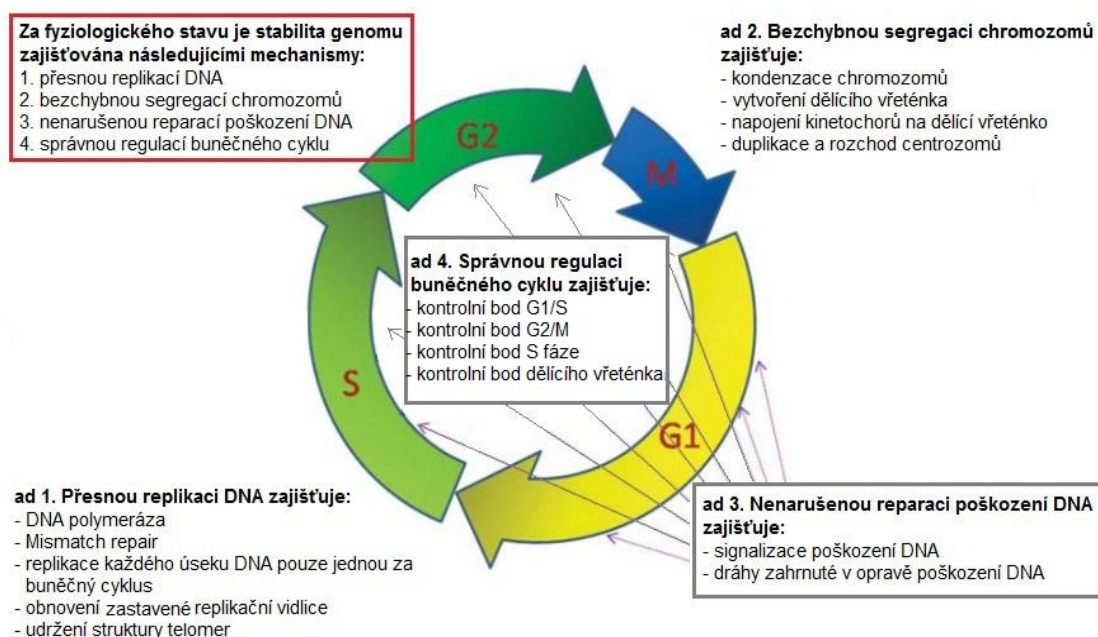
Pojem „epigenetika“ definuje změny v genové expresi, které nejsou zapříčiněny změnami v primární struktuře DNA. Úlohou epigenetických modifikací, především metylace DNA, je regulace genové exprese. Metylace oblasti promotoru určitého genu a následné změny, jako deacetylace histonů a remodelace chromatinu, vedou k umlčení jeho exprese. Tím buňka reguluje zejména aktivitu protoonkogenů. Narušení systému epigenetických modifikací určitých genů vede k aktivaci onkogenů nebo inaktivaci nádorových supresorových genů. Právě hypometylace promotorových oblastí protoonkogenů a naopak hypermetylace nádorových supresorových genů jsou spojovány se vznikem nádorů (Jones a Baylin, 2002). Změny v metylaci DNA byly popsány např. u BRCA (Muller *et al.*, 2003), CRC (Frazier *et al.*, 2003) a u nádorového onemocnění slinivky (Sato *et al.*, 2003).

2.3.3. Integrita genomu a nádorová onemocnění

Výše zmíněné genetické a epigenetické změny spolu s poruchou reparace poškození DNA mají souvislost se změněnou stabilitou genomu. I současné poznatky nasvědčují tomu, že většina lidských nádorových onemocnění vzniká v důsledku neschopnosti buňky udržet stabilitu genomu. Neporušená integrita genomu je jedním z klíčových předpokladů pro udržení celkové buněčné homeostázy a prevenci vzniku maligního zvratu. Genetická informace v každém buněčném jádře je denně vystavena působení celé řady negativních vlivů. Předpokládá se, že denně vznikne v každé buňce více než 10 000 různých lézí a poškození DNA (Jackson a Bartek, 2009). Průměrně tak dochází k více než třem narušením struktury DNA v milionu párů bází nezreplikovaného lidského genomu denně. Pokud by takto vysoká hladina poškození DNA byla vztažena k počtu párů bází jednotlivých chromozómů lidského genomu v nezreplikovaném stavu, postihlo by nejdelší lidský chromozóm denně téměř 800 poškození DNA.

Vzhledem k tomu, že náchylnost DNA k poškození je relativně vysoká a četnost chyb extrémní, vyvinuly živé organismy vysoce komplexní a regulovatelnou síť opravných mechanismů, aby se poškození DNA nepřenášelo na generace dceřiných buněk. Proces, při kterém dochází k duplikaci genomu a jeho rozdělení z buňky mateřské na buňky dceřiné, je nepostradatelnou součástí života většiny somatických buněk. Za normálního fyziologického stavu je stabilita genomu zajišťována následujícími mechanismy: přesnou replikací DNA, bezchybnou segregací chromozómů

v průběhu mitózy, nenarušenou reparací poškození DNA, správnou regulací postupu buněčného cyklu přes kontrolní body (*Obr. 5; Shen Z, 2011*).



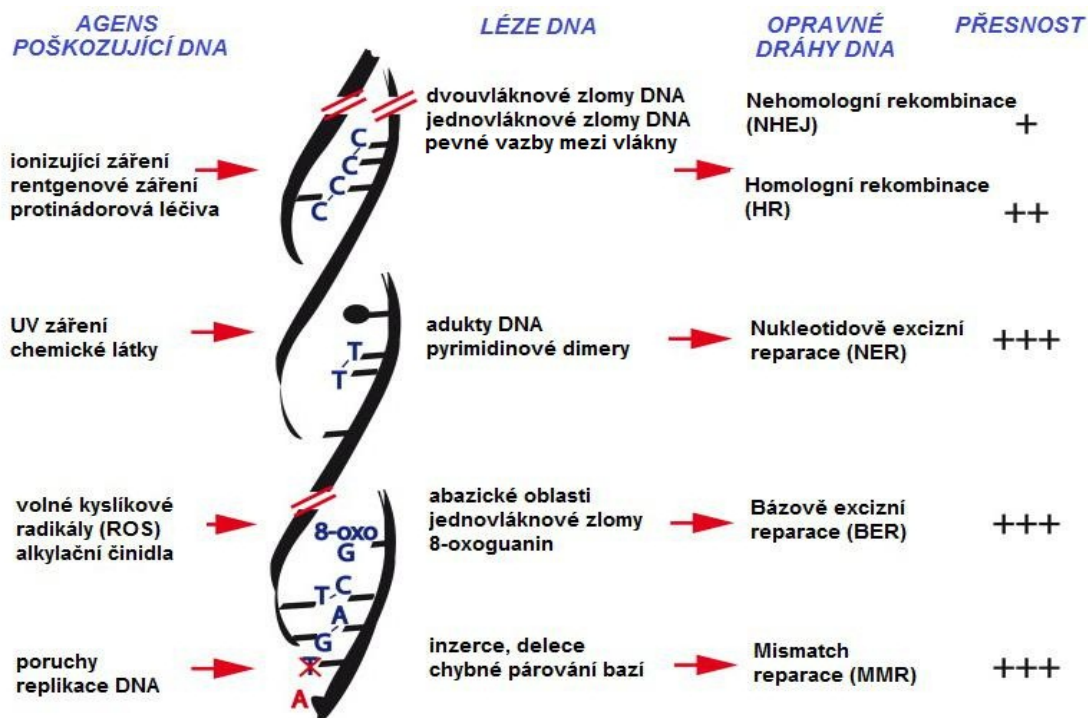
Obr. 5: Jednotlivé fáze buněčného cyklu a mechanismy zajišťující stabilitu genomu (obr. překreslen dle: Shen Z, 2011).

Narušená regulace průběhu buněčného cyklu (Naccarati *et al.*, 2012b) a alterovaná reparační kapacita DNA (Natarajan, 2008) mohou vyústit v maligní buněčný proces, kdy jsou selektovány abnormální buňky s nerovnováhou mezi buněčným dělením a apoptózou. Právě mutace genů, které jsou zodpovědné za reparaci DNA, kontrolu průběhu buněčného cyklu, buněčného dělení a tvorbu mitotického vřeténka mohou vést k narušené genetické stabilitě a k akumulaci poškození DNA v genomu. Genomová instabilita může vyústit ve vznik strukturních CHA, které jsou přímým důsledkem neopraveného nebo chybně opraveného poškození DNA (Romney *et al.*, 2001; Shen Z, 2011).

2.4. Poškození DNA a jeho oprava

Různé typy poškození DNA jsou rozpoznávány a opravovány specifickými reparačními drahami. Léze postihující pouze jedno vlákno DNA jsou v savčích buňkách reparovány vysoce přesným mechanismem báze excizní reparace (base excision repair, BER), nukleotidové excizní reparace (nucleotide excision repair, NER) a nebo opravou chybného párování bází (mismatch repair, MMR). Naopak dvouvláknové zlomy DNA (double strand breaks, DSB) jsou opravovány v závislosti na fázi buněčného cyklu homologní rekombinací (homologous recombination, HR) a nehomologním

spojováním konců (non homologous end joining, NHEJ; Pfeiffer *et al.*, 2004). DSB představují pro buňku enormní genotoxické riziko především z důvodu možné ztráty genetické informace v průběhu buněčného dělení.



Obr. 6: Opravné mechanismy poškození DNA.

DSB jsou opravovány méně přesnými drahami než jednovláknové zlomy (obrázek překreslen dle: Blanpain *et al.*, 2011).

Ionizující záření je jeden z hlavních faktorů, který vytváří vedle jednovláknových zlomů (single strand breaks, SSB; opravovaných pomocí BER) i DSB, a aktivuje tak kaskádu proteinů zahrnutých v HR a NHEJ. Negativní dopad ionizujícího záření na buňky byl prokázán již koncem 19. století Röntgenem (Crocker, 1897), ale až v 70. letech 20. století byla popsána přímá souvislost mezi expozicí ionizujícímu záření a vznikem nádorového bujení (Mole, 1975). Kromě toho mají DSB i endogenní původ. Přechodné zlomy vznikají při oxidativním metabolismu, působením topoizomeráz, při replikaci DNA, reparaci, rekombinaci DNA (crossing-overu) a V(D)J rekombinaci imunoglobulinových genů. Mutagenem s podobným účinkem jako ionizující záření, který se zároveň používá při léčbě různých typů nádorů, je radiomimetikum bleomycin (BLM; Adema *et al.*, 2003), což je antibiotikum produkované bakteriemi *Streptomyces verticillus*. Mechanismus účinku BLM je velmi komplikovaný a nebyl zatím zcela popsán. Bylo však prokázáno, že BLM se interkaluje mezi páry nukleotidových bází, kde po navázání iontů kovu vytváří SSB a DSB fragmentací molekuly DNA (Asakura *et al.*, 1975). V této práci byl použit BLM pro měření reparační kapacity DSB u nádorových pacientů a zdravých osob.

Informace o opravách DSB v procesu karcinogeneze nejsou známy. V současné době existují pouze kusé informace o kapacitě BER a NER v souvislosti se vznikem maligního procesu (Slyskova *et al.*, 2012a,b). Nejnovější práce naší laboratoře, porovnávající reparační kapacity DNA v periferních lymfocytech (peripheral blood lymphocytes, PBL) u zdravých jedinců a pacientů s nádorovým onemocněním, popisuje pouze mírné narušení NER u CRC. Těchto poznatků lze využít pro vhodnější výběr protinádorové terapie. Co je však řídicím faktorem, který vede k maligní transformaci a vzniku CRC u člověka, zůstává v současné době stále neobjasněno (Slyskova *et al.*, 2012a,b).

2.4.1. Odpověď na poškození DNA

Detekce a oprava DSB je zprostředkována tzv. „mechanismem odpovědi na poškození DNA (DNA damage response, DDR). Tento proces může zahrnovat aktivaci kontrolního bodu buněčného cyklu, expresi nádorových supresorových genů a následnou opravu poškození DNA. Pokud je však stupeň narušení chromatinu příliš vysoký, dochází k iniciaci buněčné smrti. DDR je řízen na základě posttranslačních modifikací cílových proteinů, což jsou enzymatické reakce jako např. fosforylace, ubiquitinace, sumoylace, acetylace a poly ADP-ribosylace (Lees-Miller *et al.*, 1990, 1992, Ma *et al.*, 2002, 2005, Mailand *et al.*, 2007, Stewart *et al.*, 2009). Důležitou úlohu při regulaci exprese proteinů opravy DNA mají také malé regulační molekuly RNA (microRNA; Volinia *et al.*, 2006).

Oprava DSB je obecně relativně rychlý proces, ke kterému dochází v rozmezí sedmi až devadesáti minut po indukci poškození DNA (Metzger a Iliakis, 1991). Tato široká časová škála je dána rozdílným mechanismem obou opravných drah, přičemž většina DSB je pomocí NHEJ opravena do patnácti minut. HR je výrazně pomalejší proces, kdy k opravě majoritní části zlomů dochází do devadesáti minut po jejich vzniku (Chiolo *et al.*, 2011, Metzger a Iliakis, 1991).

HR i NHEJ vyžadují specifické proteiny a fungují především v určitých fázích buněčného cyklu. Kaskáda proteinů zahrnutých v HR je aktivována v G2 a v pozdní S fázi buněčného cyklu, kdy jsou chromozómy již zreplikovány, a může být využito sesterské chromatidy jako templátu pro relativně bezchybnou reparaci narušeného vlákna DNA (Takata *et al.*, 1998). Méně přesná dráha NHEJ, která představuje “pouze“ zpětné spojení poškozených konců DNA (Grawunder *et al.*, 1998), je spouštěna při opravě DSB v průběhu celého buněčného cyklu. Funguje ale především v G0 a G1 fázi cyklu (Natarajan, 2008). NHEJ je využito při opravě majoritní části DSB (85%), což je dáno především jejím výhradním zastoupením v nejdélejší fázi buněčného cyklu (G1 fázi; Chiolo *et al.*, 2011, Metzger a Iliakis, 1991).

V současné době je známo, že výběr mezi oběma drahami je regulován několika faktory. Jde o stupeň sbalení chromatinu (Chiolo *et al.*, 2011), fázi buněčného cyklu a také konverzi (resekci) DSB na jednovláknovou DNA (single stranded DNA, ssDNA; Falck *et al.* 2012). Resekce představuje vytvoření přesahů ssDNA z konců původního DSB, které umožňují invazi homologní sekvence na

sesterské chromatidě v průběhu HR. Další důležitý aspekt při výběru jedné z drah představuje stupeň sbalení chromatinu. Pokud DSB postihne heterochromatin, dochází především k aktivaci HR (Chiolo *et al.*, 2011). Jak ale buňka rozlišuje mezi určitými stupni komprimace chromatinu a kdy je ještě struktura považována za heterochromatin není v současné době známo. Tyto nejnovější poznatky potvrzují úroveň komplexnosti celého systému.

2.4.1.1. Oprava dvouvláknových zlomů DNA

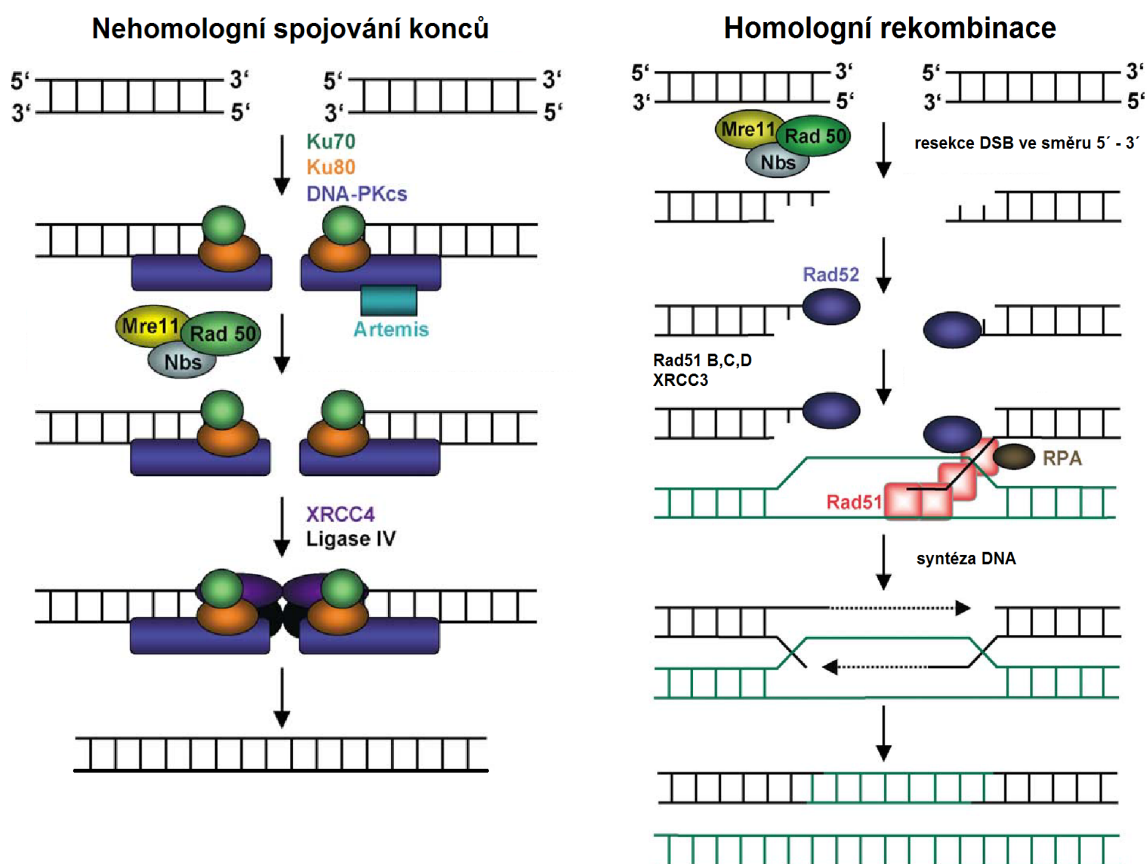
2.4.1.1.1. Nehomologní spojování konců

Opravná dráha NHEJ je iniciována rozpoznáním narušených konců dvoušroubovice DNA, k čemuž je využit sensorový proteinu Ku (X-ray repair cross-complementing 5). Heterodimer Ku je ATP-dependentní DNA helikáza, která se po indukci DSB váže na volné konce DNA a vytváří tak platformu pro akumulaci reparačních enzymů. Jedním z opravných proteinů je i DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit; Gottlieb a Jackson, 1993), která po vazbě na sensorový protein Ku vytváří obdobu molekulárního mostu. Tímto procesem dojde k přiblížení poškozených konců DNA k sobě (Waterings *et al.*, 2010). Zároveň je iniciována vlna posttranslačních modifikací různých substrátů prostřednictvím kinázové aktivity DNA-PKcs (Lees-Miller *et al.*, 1990, 1992). DNA-PKcs mimo jiné autofosforyluje i sama sebe, čímž pravděpodobně ovlivňuje výběr mezi HR a NHEJ (Neal *et al.*, 2011). Substrátem DNA-PKcs je také nukleáza Artemis, která v případě potřeby svou exo- a endo-nukleázovou aktivitou odstraní poškozené báze v oblasti DSB, jež by mohly bránit zpětnému propojení volných konců molekuly DNA (Ma *et al.*, 2002, 2005). Konečnou fází opravy DSB je spojení konců DNA pomocí DNA ligázy 4 a faktoru XRCC4 (X-ray repair cross-complementing 4; Grawunder *et al.*, 1997).

Průběh NHEJ je ovlivňován i proteiny, které jsou charakteristicky zapojeny při HR (Paull *et al.*, 2001, Zhuang *et al.*, 2006). Překvapivé je především využití komplexu MRN (Meiotic recombination 11, Radiation sensitive 50, Nijmegen breakage syndrome; Mre11, Rad50, Nbs1) při NHEJ v G1 fázi buněčného cyklu (Quennet *et al.*, 2011). Obě dráhy se pravděpodobně do určité míry prolínají. Nevýhodou NHEJ však je, že buňka při využití této opravné dráhy vždy podstupuje určité riziko ztráty genetické informace. Na druhou stranu denzita kódující DNA je u eukaryotických buněk velmi nízká, a proto je i možnost nenávratného poškození určitého genu relativně malá.

2.4.1.1.2. Homologní rekombinace

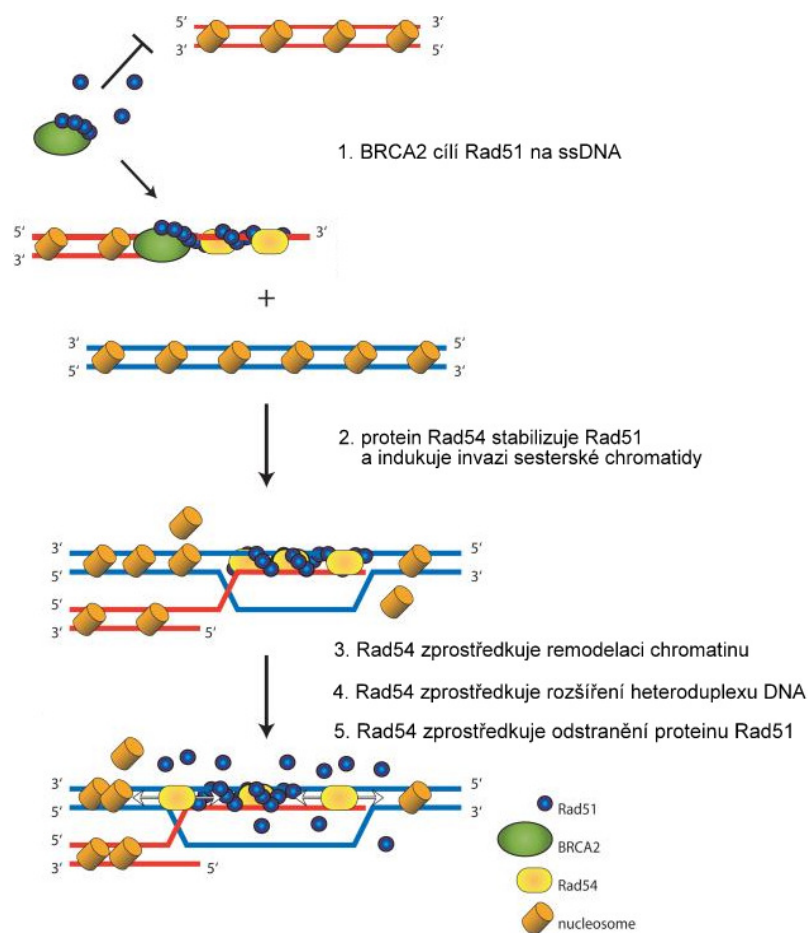
HR je iniciována aktivací enzymu PARP (Poly [ADP-ribose] polymerase), který začne v oblasti poškození DNA katalyzovat tvorbu síťových struktur z cukerných zbytků (Rolli *et al.*, 2000). Do takto vytvořených molekulárních sítí jsou atrahovány reparační proteiny prostřednictvím svých specifických domén. Jedním z těchto proteinů je i heterotrimer MRN (Lee a Paull, 2004, Haince *et al.*, 2007), který společně s dalšími proteiny (Sartori *et al.*, 2007) zahajuje resekci DSB na ssDNA přesahy (Nimonkar *et al.*, 2011). Poslední zmíněný protein tohoto trimeru (Nbs1 neboli Nibrin) umožňuje vazbu aktivované kinázy ATM (Ataxia telangiectasia mutated; You *et al.*, 2005), která svou fosforylační aktivitou modifikuje funkci mnoha reparačních enzymů. Substrátem kinázy ATM je mimo jiné i specifická varianta histonu H2A (histone 2AX, H2AX). Histon H2AX je kinázou ATM robustně fosforylován v rozmezí dvou milionů bází v oblasti DSB (Rogakou *et al.*, 1998). Dojde tak k remodelaci chromatinu a vytvoření vazebného místa pro proteiny, které iniciují další vlnu posttranslačních modifikací při DDR (Mailand *et al.*, 2007, Stewart *et al.*, 2009). Výsledkem celého procesu je ovlivnění funkce cílových proteinů, zastavení průběhu buněčného cyklu a umožnění reparace poškození DNA.



Obr. 7: Oprava DSB prostřednictvím NHEJ a HR. Převzato z: Christmann *et al.*, 2003.

Invaze sesterské chromatidy v průběhu homologní rekombinace

Konečnou fází opravy DSB prostřednictvím HR je invaze sesterské chromatidy, ke které může dojít za předpokladu degradace 5' konců DSB. Na takto vytvořené přesahy ssDNA se váže replikační protein A (RPA), který je nezbytný pro akumulaci rekombinázy Rad51 (Radiation sensitive 51; Sugiyama, 1997). Protein Rad51 je nepostradatelný pro invazi sesterské chromatidy. Vzniklé nukleoproteinové vlákno složené ze šesti monomerů Rad51 a 18 bází DNA (Ogawa *et al.*, 1993) se může vychýlit, protáhnout, efektivně vyhledat homologní sekvenci (Klapstein *et al.*, 2004) a následně invadovat sesterskou chromatidu. V průběhu propojení obou chromatid dojde k vytvoření tzv. „D-smyčky“, kdy se mezi sebou párují komplementární úseky genetické informace sesterských chromatid (Szostak *et al.*, 1983). Výsledkem HR je syntéza nového vlákna podle vzoru druhé chromatidy a následná ligace přerušení v molekule DNA.



Obr. 8: Průběh invaze sesterské chromatidy při HR (upraveno z: Forget a Kowalczykowski, 2010).

2.4.2. Polymorfismy v genech zodpovědných za reparaci poškození DNA

Hagmar *et al.* (2004) dospěl ve své publikaci k názoru, že jednonukleotidové záměny (Single-nucleotide polymorphism, SNP) genů opravy poškození DNA mohou být pravděpodobnou příčinou snížené opravné kapacity a mohou souviset se zvýšenou hladinou CHA, což bylo ve stejném roce prokázáno v naší laboratoři, avšak pouze pro opravu SSB (Vodicka *et al.*, 2004). SNP představují stav, kdy v určité populaci existují alespoň dvě varianty genů pro jeden znak a zároveň je procentuální zastoupení minoritní alely vyšší než 1%. Pokud je frekvence výskytu této alely nižší, jde o mutaci. SNP v reparačních genech DNA jsou v současné době považovány za jeden z důležitých faktorů modulujících riziko vzniku nádoru (Naccarati *et al.*, 2007, Vodicka *et al.*, 2007). V této diplomové práci jsou studovány SNP v genech důležitých pro opravu DSB prostřednictvím HR v souvislosti s reparační kapacitou u nádorových pacientů a zdravých osob (Tab. 3).

Gen	Funkce proteinu
XRCC3	Xrcc3 stabilizuje Rad51 v oblasti DSB (Bishop <i>et al.</i> , 1998). Jedná se o jeden z paralogů rekombinázy Rad51 (Tebbs <i>et al.</i> , 1995). Mutanty XRCC3 vykazují defektní rekombinaci při HR, zvýšenou citlivost k ionizujícímu záření a narušenou opravu DSB (Takata <i>et al.</i> , 2001).
RAD54L	Úlohou proteinu Rad54L je stabilizovat nukleoproteinové vlákno, tvořené proteiny Rad51 a přesahy ssDNA (Alexeev <i>et al.</i> , 2003). Delece genu RAD54L vede k narušené invazi sesterské chromatidy (Dronkert <i>et al.</i> , 2000), ale paradoxně také ke snížení hladiny indukovaných CHA (Sasaki <i>et al.</i> , 2004). Mutanty RAD54L mají narušený průběh HR a vyšší citlivost k ionizujícímu záření (Essers <i>et al.</i> , 1997).

Tab. 3: Geny, u kterých byly v této diplomové práci studovány polymorfismy.

Práce, jež studují vztah mezi chromozomálním poškozením v PBL u zdravých osob či pacientů s nádorovým onemocněním v souvislosti s SNP ve vybraných kandidátních genech zodpovědných za reparace poškození DNA, jsou vzácné (Vodicka *et al.*, 2004, Skjelbred *et al.*, 2006, 2007 Erratum) a jejich výsledky jsou nesourodé (Vodicka *et al.*, 2006). Kontroverzní zjištění mohou být dána tím, že oproti zásadním změnám, jako jsou delece genů u Xeroderma pigmentosum, představují polymorfní alely genů opravujících poškození DNA pouze predisponující faktor rozvoje nádoru, ale nemusí nutně zapříčinit jeho vznik. Jsou proto důležité další studie, které by potvrdily že interindividuální odpověď na exogenní i endogenní působení genotoxických látek je modulována SNP genů zahrnutých při DDR (Shen MR *et al.*, 1998, Vodicka *et al.*, 2007).

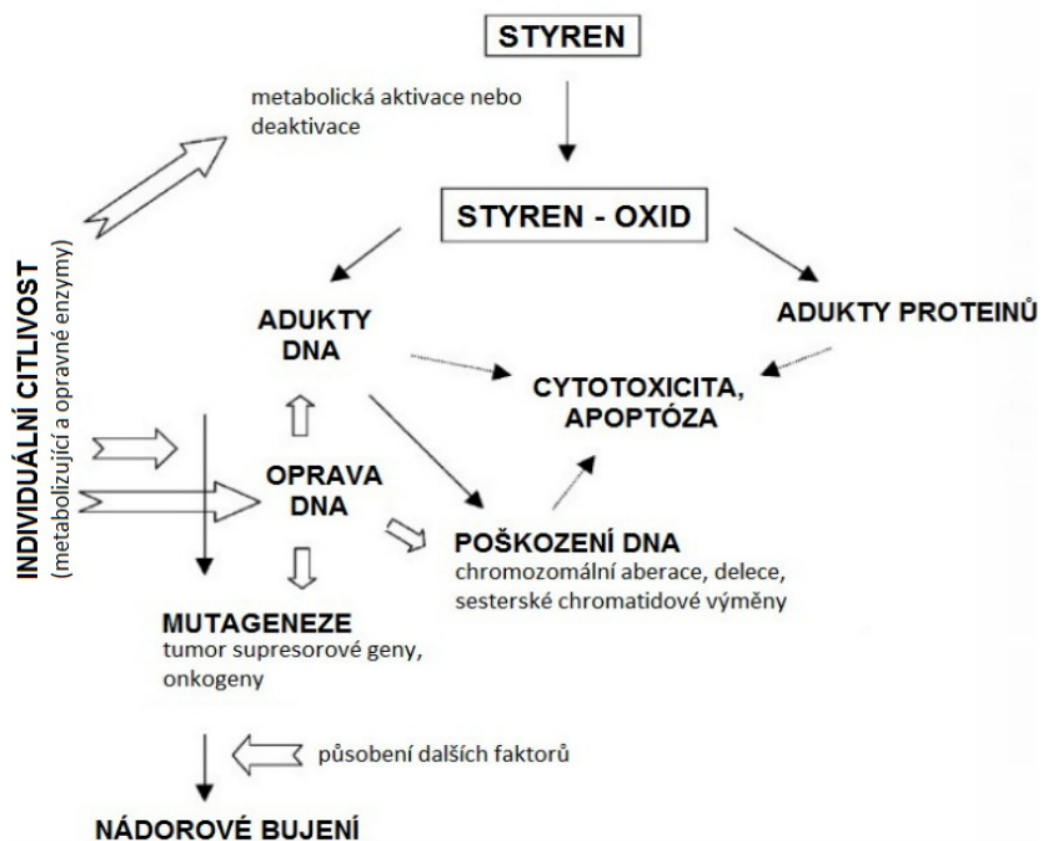
I když bylo popsáno relativně mnoho SNP v genech reparace DNA (Peters *et al.*, 2012, Spain *et al.*, 2012), a to i v souvislosti s nádorovými onemocněními (Theodoratou *et al.*, 2012), předpokládá se, že jejich efekt je různý v závislosti na konkrétním genu (Naccarati *et al.*, 2007).

Nejnovější výsledky z celogenomové asociační studie (Genome-wide association studies, GWAS) porovnávající pacienty s CRC a zdravé osoby, prokazují významné, byť procentuálně nepříliš vyjádřené riziko CRC, spjaté s dvaceti lokusy (Dunlop *et al.*, 2012). V další studii zaměřené na DDR a opravy DNA, pouze SNP v promotoru pro nádorový supresorový gen MLH1 a vzácné záměny v genu CHEK2 jsou pravděpodobně odpovědné za vyšší vnímavost vůči CRC. Mimo těchto popsaných málo četných polymorfismů má právě kombinace různých SNP jako celku prokazatelnou souvislost s nádorovým onemocněním (Tomlinson *et al.*, 2012). Pouze při jedné GWAS byl popsán SNP v genu, který je zahrnut v reparační dráze HR. Jednalo se o SNP v genu RAD51 ve vztahu ke zvýšenému riziku BRCA (Thomas *et al.*, 2009). V současné době, v rámci projectu Cancer Genome Project, se popisují velmi zajímavé zárodečné i somatické mutace v reparačních genech DNA (polymeráza η (éta) a δ (delta)), které mají vztah k rozvoji nádorových onemocnění (Palles *et al.*, 2013). Kromě těchto polymorfismů byla také popsána souvislost mezi SNP ve 3' nepřekládaných oblastech genů reparace poškození DNA ve spojitosti se zvýšeným rizikem rozvoje CRC (Naccarati *et al.*, 2012a).

2.5. Biomarkery

Expozice karcinogenním látkám zahrnuje řadu událostí od jejich absorpce, metabolismu, vazby na DNA a následné indukce mutací či chromozomálních poškození. Pro studium těchto dějů lze využít různé typy biomarkerů, které mohou objasnit mechanismus genotoxického působení stejně jako individuální odpověď na mutagen (Vodicka *et al.*, 2001, 2002). Biomarkery představují znaky biologických procesů, které lze výběrem vhodné metody kvantifikovat a získat tak představu o rozdílech mezi normálním a abnormálním biologickým stavem. Měření vhodně zvolených biomarkerů může poskytnout důležité diagnostické a prognostické informace a napomoci tak k výběru léčebné terapie (Cole *et al.*, 2013). Mezi biomarkery patří např.: změny v genové expresi, CHA a přítomnost neobvyklých metabolitů v tělních tekutinách *in vivo*. Pro rozdělení biomarkerů do skupin uvádíme jako model genotoxické působení styrenu, které bylo dlouhodobě studováno v laboratoři školitele, Dr. Vodičky (Obr. 9).

Jako příklad tzv. *biomarkeru expozice* lze uvést přítomnost styren-oxidu v PBL exponovaných jedinců, kde tvoří společně s DNA a s proteiny addukty (kovalentní vazba cizorodé reaktivní molekuly na biomakromolekuly; Vodicka *et al.*, 2002). Indikátorem expozice je obecně identifikace a kvantifikace určitých metabolitů v těle. Jedná se o velmi specifickou, ale málo prediktivní metodu, a proto je pro předpověď případných zdravotních následků potřeba sledovat ještě nějaký další biomarker (Au, 2005). Nejčastěji sledovanými *biomarkery časného biologického účinku* nebo *biomarkery spojenými se zdravotním rizikem* jsou např. CHA, adukty DNA, sesterské chromatidové výměny (sister chromatid exchange, SCE) či mikrojádra (micronucleus, MN; Albertini *et al.*, 2000).



Obr. 9: Kaskáda procesů vedoucí od expozice styrenu až k nádorovému bujení (přepřacováno z: Vodicka *et al.*, 2002).

2.5.1. Typy biomarkerů

2.5.1.1. Mikrojádra

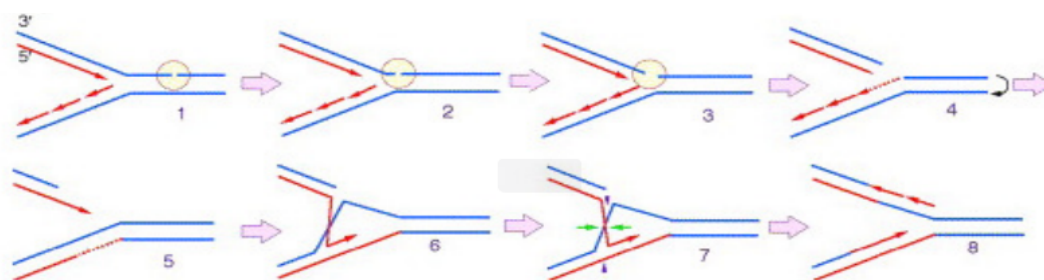
MN jsou kromě své velikosti strukturně i morfologicky podobná buněčným jádrům. Hematologové Howell a Jolly poprvé pozorovali tyto struktury na přelomu 19. a 20. století (Howell, 1890). V současné době je známo, že MN obsahují acentrické fragmenty chromozómů, či celé chromozómy. Po silné expozici klastogennímu agens se vytvoří četná poškození DNA. Některé z indukovaných DSB zůstanou neopraveny, což vyústí ve vznik acentrických fragmentů chromozómů. Tyto fragmenty nemohou být přeneseny do dceřiných jader, protože absence centromery jim neumožňuje vazbu na dělicí vřeténko. Zůstávají tak po telofázi buněčného dělení v cytoplasmě ohraničené jadernou membránou a jsou dobře pozorovatelné v následujícím buněčném dělení (Fenech *et al.*, 2011).

MN patří mezi cytogenetické biomarkery a jsou sledovány v PBL při studiu expozice jedince genotoxickému působení. Rozsáhlá kohortová studie prokázala asociaci mezi hladinou MN v PBL a predispozicí k nádorovému bujení (Bonassi *et al.*, 2007).

V některých studiích bylo však zjištěno, že vyšší věk ovlivňuje výsledné množství MN, což může být způsobeno i častou ztrátou chromozómu X, zejména u starších žen. Tato souvislost nebyla prokázána pro frekvence dalších často sledovaných biomarkerů – CHA (Hagmar et al., 1998) a SCE (Bolognesi et al., 1997). Studium frekvence MN je proto omezeno koncepcí celého pokusu a složením skupiny sledovaných osob.

2.5.1.2. Sesterské chromatidové výměny

SCE byly pozorovány již před více než půl stoletím při pokusech s radioaktivně značenými nukleotidy (Taylor JH et al., 1958). Jedná se o výměnu částí homologních úseků DNA dvou sesterských chromatid. Pokud vedoucí vlákno v průběhu replikace DNA narazí na SSB, může dojít k zreplikování poškození a vzniku DSB. Aby nedošlo k odtržení nově syntetizované části chromozómu, musí buňka spustit HR. Dojde tak k výměně částí sesterských chromatid mezi sebou (Obr. 10, Wilson a Thompson, 2007).



Obr. 10: Mechanismus vzniku SCE.

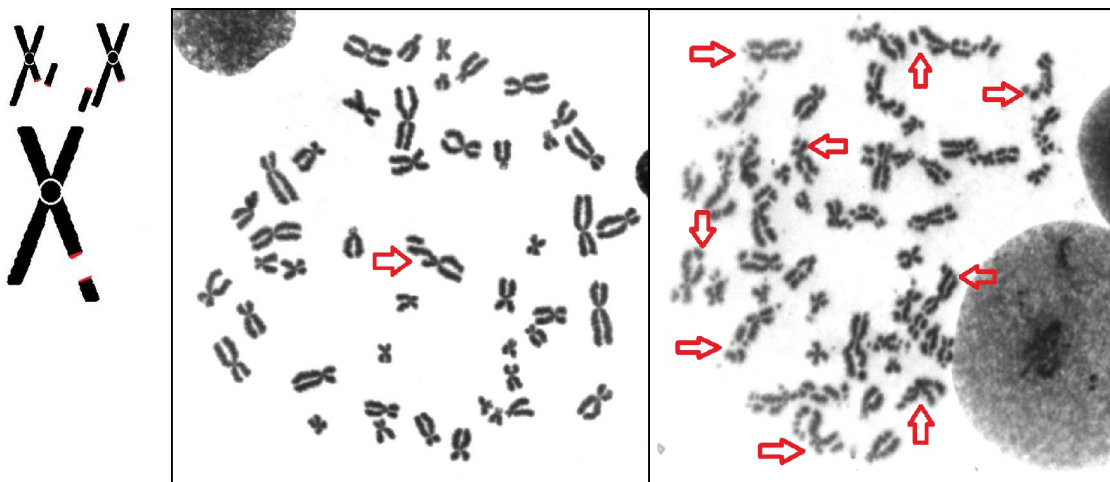
Kroky 1-3 znázorňují replikaci DNA, 4. krok vznik DSB, 5-7. krok HR a 8. krok SCE (přepřacováno z: Wilson a Thompson, 2007).



Obr. 11: Buňka v metafázi buněčného dělení s vysokou hladinou SCE.

2.5.1.3. Strukturní chromozomální aberace

CHA v PBL jsou považovány již od šedesátých let 20. století za ukazatel hladiny poškození DNA (Albertini *et al.*, 2000). Jsou indikátorem mutagenního ovlivnění a schopnosti jedince vyrovnat se s poškozením DNA. Bylo publikováno několik kohortových studií, které prokázaly že zvýšená hladina CHA představuje relevantní biomarker pro riziko vzniku nádoru (Hagmar *et al.*, 1994, 1998, Bonassi *et al.*, 1995, Norppa *et al.*, 2006). CHA jsou proto v současné době považovány za časný biomarker karcinogeneze a dávají prostor k posouzení rizika možného nádorového onemocnění. V celé řadě prací byl prokázán vztah mezi významně zvýšenou predispozicí k různým typům nádorových onemocnění a hladinou CHA indukovaných v PBL pomocí BLM (Zheng *et al.*, 2003, Szekely *et al.*, 2005, Laczmanska *et al.*, 2007, Sigurdson *et al.*, 2011). V metafázi buněčného dělení lze pozorovat různé typy CHA. V této práci jsme sledovali hladinu chromatidových zlomů (CHT zlomů, Obr. 12), indukovaných pomocí BLM. Zaznamenávali jsme také ostatní CHA z důvodu posouzení předchozí expozice genotoxickým látkám.



Obr. 12: Chromatidové zlomy.

Vlevo je znázorněno schéma CHT zlomů, uprostřed buňka s jedním CHT zlomem a vpravo buňka s vysokou hladinou CHT zlomů a gapů (z celkového množství zlomů je vyznačena pouze malá část).

2.5.1.3.1. Historie studia mechanismů vzniku CHA

V průběhu uplynulých více než sedmdesáti let bylo formulováno několik teorií s cílem objasnit vznik CHA. Nejstarší teorie „breakage and reunion“ (Sax, 1940, 1941, Lea, 1946) vznikla ještě v době, kdy nebyla známa struktura DNA. Teorie popisuje indukci tzv. „primárních zlomů“ chromozómů v důsledku vystavení chromatinu ionizujícímu záření. Osudem těchto lézí může být jejich zpětné spojení bez dopadu na morfologii chromozómu nebo chybné spojení s jiným zlomem na stejném chromozómu nebo na jiném chromozómu, což může dát vznik strukturním CHA, patrných

v metafázi buněčného dělení. Poslední část této klasické teorie doplnil Lea o názor, že primární zlomy mohou zůstat jednoduše otevřené a vytvářejí tak CHT zlom (Lea, 1946).

S postupným rozšiřováním poznatků v oblasti stavby chromatinu byla navržena Revellova „exchange“ teorie, která vycházela z předpokladu, že CHA vznikají z interakcí dvou lézí, které se nacházejí v dostatečné blízkosti na překřížených smyčkách chromatidových domén (Revell, 1959). Ani tato teorie není pravděpodobně správná, protože při často užívaných metodách (indukce aberací mutagenem) se používá relativně malá dávka ozáření (0,5 Gy), což pravděpodobnost vzniku takového množství zlomů, aby se nacházely ve vzájemné bezprostřední blízkosti, minimalizuje.

Přesto, že vznik CHA není do všech detailů objasněn, je jasné, že primární lézí pro jejich indukci jsou DSB a strukturní CHA jsou výsledkem neopraveného či chybně opraveného poškození DNA (Romney *et al.*, 2001).

2.5.1.3.2. Chromatidové vs. chromozómové aberace

CHA mohou postihnout jednu či obě chromatidy v rámci jednoho chromozómu. Dělíme je proto na CHTA (postihují pouze jednu chromatidu) a CHSA (postihují obě sesterské chromatidy jednoho chromozómu; Evans a Savage, 1963). Schéma a popis typů CHA jsou uvedeny na str. 38 (kapitola „Metodika“).

BLM patří mezi typy genotoxických agens, které indukují v závislosti na fázi buněčného cyklu vznik CHSA (např. dicentrických chromozómů) i CHT zlomů. Pokud je buňka v G1/G0 fázi buněčného cyklu vystavena působení BLM, dojde ke vzniku CHSA, protože původně vzniklý DSB projde v průběhu S fáze buněčného cyklu replikací. Naopak v S/G2 fázi buněčného cyklu vznikají pouze CHT zlomy, protože obě chromatidy jsou již zreplikovány. Další možností je vystavení buňky BLM v průběhu S fáze, kdy ještě není genetická informace kompletně zreplikována. V takovém případě dochází ke vzniku CHSA i CHT zlomů (Evans a Savage, 1963, Buckton *et al.*, 1973). Ke vzniku CHA tedy radiomimetické látky nevyžadují S fázi buněčného cyklu. Naopak valná většina chemických látek (např. alkylační činidla) z vnějšího prostředí a UV záření jsou na S fázi závislé, protože jejich genotoxické působení souvisí s S fází a vznikem SSB (Evans a Scott, 1969). Chybnou enzymatickou opravou SSB či jeho replikací může jako intermediát vzniknout DSB (Evans a Scott 1969, Bender *et al.*, 1974)

2.5.1.3.3. Chromozomální aberace a nádorová onemocnění

Některé CHA hrají primární úlohu při vzniku nádorů, jako přestavby v oblasti protoonkogenů, (př. chronická myeloidní leukemie, CML, Burkittův lymfom, BL) nebo delece částí chromozómů,

obsahující nádorové supresorové geny (př. retinoblastom). Jiné CHA (chromozomální zisky, ztráty a přestavby) jsou sekundárním důsledkem genomové nestability buňky v maligním procesu.

Kromě změn přítomných přímo v nádorové tkáni nacházíme CHA v PBL, a to většinou v malém podílu těchto buněk. Pokud hladina CHA nepostihuje více než 4% cytogeneticky hodnocených buněk, nejedná se o výrazně zvýšené zdravotní riziko. Cytogenetické alterace jsou biomarkerem působení genotoxických karcinogenů (Knudsen a Hansen, 2007), ale jsou současně i ukazatelem individuální senzitivity ke genotoxickému působení a individuální schopnosti reparovat poškození DNA. CHA jsou považovány za prediktivní faktor pro riziko sporadických nádorů, které jsou pozdním důsledkem genotoxického působení (Rossner *et al.*, 2005, Boffetta *et al.*, 2007, Vodicka *et al.*, 2010). Statisticky významná souvislost mezi četností CHA a predispozicí ke vzniku nádorového bujení byla prokázána zejména pro nádory trávicího traktu a CRC, v menším rozsahu také pro nádory plic (Rossner *et al.*, 2005, Boffetta *et al.*, 2007). Byl také popsán vztah mezi frekvencí CHA a BRCA (Vodicka *et al.*, 2010).

Na rozdíl od prospektivních studií výše uvedených autorů, Vodicka *et al.* (2010) porovnávali hladinu CHA u pacientů s nově zjištěným nádorovým onemocněním s hladinou CHA u zdravých osob. Statisticky významně vyšší úroveň chromozomálního poškození byla zjištěna u pacientů s BRCA, nádory dělohy a vaječníku, prostaty a zvláště pak hlavy a krku, autoři však nepotvrdili zvýšení CHA u gastrointestinálních nádorů. Co se týká prediktivní hodnoty jednotlivých typů CHA pro zvýšené riziko vzniku nádorů, tj. CHSA a CHTA, literární údaje nejsou jednotné (Rossner *et al.*, 2005, Boffetta *et al.*, 2007).

Protože CHA jsou důsledkem neopraveného nebo chybně opraveného poškození DNA, zvláště DSB (Obe *et al.*, 2002, Pfeiffer *et al.*, 2004), je reparace poškození DNA rozhodujícím mechanismem pro udržení genomové stability. Porucha reparace DNA zvyšuje náchylnost buněk k poškození DNA, akumulaci mutací v genomu a ke vzniku CHA. CHA lze tedy využít i jako funkčního biomarkeru ke studiu reparační kapacity DNA.

2.5.2. Test indukce aberací bleomycinem, tzv „Challenge assay“

Pravděpodobně nejvhodnější metodou studia reparační kapacity DNA, využívající CHA jako funkčního biomarkeru, je tzv. “Challenge assay” – metoda indukce aberací např. UV, X- a γ -zářením (Au a Salama, 2005) nebo, jak je tomu v případě našeho projektu, radiomimetickou látkou BLM *in vitro* (Hsu *et al.*, 1985, Szekely *et al.*, 2003, 2005, Au a Salama, 2005, Sigurdson *et al.*, 2011). Stimulované PBL dárců jsou při této metodě v průběhu G2 fáze buněčného cyklu vystaveny radiomimetickému působení BLM, které vyvolá poškození chromozómů (Hsu *et al.*, 1983). Naměřená vysoká hladina CHT zlomů působí jako nepřímý indikátor narušené schopnosti opravovat DSB (Laczmanska *et al.*, 2007). Široká škála různého množství aberací u skupiny osob je dána

tzv. „interindividuální variabilitou“ ve vnímavosti k poškozujícím faktorům (Hsu *et al.*, 1985, 1989). Výsledky mnoha studií prokazují, že měření citlivosti k působení mutagenu je nadějný ukazatel pro předpověď zvýšeného rizika rozvoje maligního bujení (Spitz *et al.*, 1989, 1995, Cloos *et al.*, 1993, Wu *et al.*, 1998, 2002).

Nejvhodnější tkání pro studium CHA jsou PBL a to především z důvodu jejich snadné dostupnosti a malé zátěže vyšetřované osoby (Salama *et al.*, 1999). PBL se v biomonitorovacích studiích využívají také pro jejich vlastnost cirkulovat tělem po relativně dlouhou dobu. V průběhu svého života jsou vystaveny působení různých toxických látek v cílových orgánech, a proto hladina poškození jejich DNA odráží expozici jedince genotoxickým faktorům a schopnost jedince reparovat poškození DNA. Velkou a unikátní výhodou PBL je i možnost jejich opakované analýzy v čase.

Opravné mechanismy DNA, zajišťující integritu genomu, obecně zamezují akumulaci mutací v rizikových genech a poškození replikační vidličky s následným replikačním stresem a chromozomální nestabilitou. Jak výše uvedené mutace, tak i chromozomální instabilita jsou součástí evoluce od adenomu ke karcinomu v procesu maligní transformace. Funkční poruchy opravy DNA a DDR jsou nejen klíčovými ději karcinogeneze, ale významně ovlivňují protinádorovou léčbu, obvykle založenou na vyvolání poškození DNA. Proto jsme se v této práci zaměřili na stanovení kapacity opravy DSB u zdravých osob a u pacientů s nově diagnostikovanými novotvary. Pro studii byla použita metoda záměrné indukce CHT zlomů pomocí BLM („Challenge test“) ke zjištění interindividuální variability při odpovědi na mutagen jak u pacientů, tak u zdravých kontrolních osob. Byla rovněž sledována souvislost s SNP genů RAD54L a XRCC3 opravy poškození DNA. Sledování hladiny CHT zlomů indukovaných BLM představuje biomarker genotoxického působení a odpovědi na mutagen a porovnání SNP uvedených genů s hladinou CHT zlomů umožňuje posouzení vlivu SNP na reparaci DSB.

3. CÍLE PROJEKTU

- 1) Stanovit hladinu chromozomálního poškození (počet chromatidových zlomů/buňku a průměrné procento aberantních buněk s chromatidovými zlomy v testu indukce chromozomálních aberací bleomycinem, tzv. „Challenge assay“) u pacientů s nově zjištěným nádorovým onemocněním a u zdravých kontrolních osob (cytogenetické vyšetření periferních lymfocytů).
- 2) Posoudit prediktivitu chromozomálních aberací jako biomarkeru rizika karcinogeneze porovnáním frekvencí chromatidových zlomů u pacientů s nově zjištěným nádorovým onemocněním a u zdravých osob.
- 3) Porovnat reparační kapacitu DNA u pacientů a zdravých osob v souvislosti s interindividuální variabilitou v odpovědi na bleomycin.
- 4) Stanovit polymorfismy vybraných kandidátních genů opravy dvouvláknových zlomů DNA (RAD54L a XRCC3) u skupiny pacientů i zdravých osob a porovnat s hladinou chromatidových zlomů indukovaných bleomycinem.

4. MATERIÁL

4.1. Vyšetřované osoby

Cytogenetické vyšetření PBL jsme provedli ze vzorků krve od nově diagnostikovaných, dosud neléčených pacientů s různými typy nádorových onemocnění (n=50) a také z krevních odběrů od zdravých osob (n=50). Skupina pacientů byla tvořena jedinci s DG BRCA (n=24; C501, C504 a C505), dále zahrnovala jedince s maligním nádorovým onemocněním trávicí trubice a zažívacích orgánů (n=18, z toho 14x DG CRC; C19, C20, C184, C187, C189), 1x maligní nádorové onemocnění pyloru (C164), 1x maligní nádorové onemocnění žaludku (C16) a 2x maligní nádorové onemocnění pankreatu (C250 a C252)). Skupina těchto nádorů je v následujícím textu značena pouze jako „DG CRC“. Dále pak vyšetřovaný soubor pacientů tvořila DG UGC (n=8, z toho 2x novotvary děložního čípku; C539), 1x děložní sliznice (C541), 1x vnější ženské pohlavní orgány (vulva; C519), 1x nádor varlat (C629), 1x prostaty (C61), 1x močového měchýře (C679)) a 1x nádorové onemocnění placenty (C181)).

Krevní odběry od těchto osob zajistila Radioterapeutická a onkologická klinika Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a Oddělení chirurgie Thomayerovy nemocnice v Praze. Vzorky krve od zdravých osob byly odebrány na Chirurgické klinice Všeobecné fakultní nemocnice a 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Část z těchto odběrů byla od dobrovolných dárců. Pacienti i zdravé osoby podepsali informovaný souhlas a studie probíhala se schválením příslušné etické komise.

U všech pacientů i zdravých osob byly zjištěny anamnestické údaje, jako např: věk, profese, kouření a užívané léky. Průměrný věk u skupiny pacientů byl 60 let (Median=61,5, Rozptyl 34-85; dále jen „Me“ a vlastní data rozptylu) a u skupiny zdravých osob 68 let (Me=64, 16-91). Abychom ověřili případný vliv kouření na hladinu chromozomálního poškození, rozdělili jsme pacienty i zdravé osoby do skupin podle toho, zda v době odběru krve kouřili, nekouřili nikdy nebo nekouřili po dobu alespoň pěti let a ty, kteří přestali kouřit před méně než pěti lety. Do skupiny nekuřáků jsme zahrnuli nekuřáky a ty, kteří přestali kouřit před více než pěti lety. Naopak skupina kuřáků zahrnovala kuřáky a osoby, které přestaly kouřit před méně než pěti lety. Méně než polovina pacientů (44%) v průběhu svého života nikdy nekouřila, ze zbylých 56% přestalo kouřit před méně než pěti lety 16% pacientů a 40% kouřilo v době odběru. Ve skupině zdravých osob 56% v průběhu svého života nikdy nekouřilo, 14% přestalo před pěti a méně lety a zbylých 30% kouřilo v době zjišťování anamnestických údajů. Některé z anamnestických údajů nebyly zahrnuty do statistického hodnocení (např. nádorová onemocnění u příbuzných (58% u pacientů; sledováno po tři generace)), jiné měly pouze informační charakter pro případné vyřazení z cytogenetického zpracování (profese a medicína ostatních chorob). Osoby s profesní genotoxickou expozicí (práce v černouhelném dole) a uživatele

polysyntetických opioidů (heroinu) jsme ze studie vyřadili. U pacientů bylo velmi důležité ověřit, zda odběr krve byl skutečně proveden před zahájením protinádorové terapie, která by ovlivnila celkovou míru chromozomálního poškození. I když jsme v průběhu celé studie cytogeneticky zhodnotili celkem 57 pacientů a 56 zdravých osob, muselo být z celkového souboru vyřazeno sedm pacientů a šest zdravých osob právě z důvodu zjištění již zahájené terapie v době odběru, u zdravých osob pak radiační expozice v minulosti.

4.2. Chemikálie a spotřební materiál

4.2.1. Potřeby pro kultivaci a cytogenetické zpracování lymfocytů

Chemikálie:

- ♦ Kompletní medium se sérem a fytohemaglutininem Chromosome medium P (EKAMTB-100, 100 ml, EuroClone S.p.A., Itálie, dodavatel Intimex).
- ♦ Bleomycin B2434, BioXtra, kryst. (1,5-2,0 units/mg; Sigma) – zásobní roztok 150 µg/ml destilované vody.
- ♦ Kolchicin (Calbiochem) – zásobní roztok 10 mg/100 ml fyziologického roztoku.
- ♦ KCl (Penta) – 0,075 M roztok, metanol (Penta), ledová kyselina octová (Sigma), Giemsa (Fluka), Sørensenův fosfátový pufr (pH=6,8), imerzní olej (Olympus).

Laboratorní plasty, laboratorní sklo:

Odběrové zkumavky (Heparin – Natrium), sterilní polyetylenové kultivační zkumavky, podložní skla a běžné laboratorní sklo.

Přístrojové vybavení:

Biohazard box pro sterilní práci, termostat, centrifuga s výkyvným rotorem, nahřívací ploténka, mikroskop Nikon a běžné vybavení laboratoře.

4.2.2 Potřeby pro izolaci DNA z periferní krve

Chemikálie:

- ♦ Promývací roztok – 1 mM MgCl₂ v 20 mM Tris-HCl (pH=8).
- ♦ Lyzační roztok – 0,32 M sacharóza, 1% Triton X-100, 50 mM MgCl₂, 12 mM Tris (pH=7,5).
- ♦ Pufr pro proteinázu K – 0,375 M NaCl, 0,12 M EDTA (pH=8).
- ♦ Směs fenol:chloroform:izoamyl alkohol (v poměru 25:24:1; 50 ml).
- ♦ 10% roztok SDS (sodium dodecyl sulfáte), 5 M roztok NaCl, 96% a 70% roztok etanolu.

- ◆ Heparináza I. (Sigma) – zásobní roztok ředěn: 50 units/5mM Tris (pH=7,5) + 1 mM CaCl₂.
- ◆ 10mM Tris (pH=8,0)/1 mM EDTA.
- ◆ Sterilní destilovaná voda Milli-Q.

Laboratorní plasty, laboratorní sklo:

Kónické zkumavky o objemu 15 ml, zkumavky Eppendorf (1,5 ml), Pasteurovy pipety a běžné laboratorní sklo.

Přístrojové vybavení:

Centrifuga s výkyvným rotorem, třepačka, autokláv Millipore Milli-Q a běžné vybavení laboratoře.

4.2.3. Potřeby pro alelickou diskriminační analýzu

Chemikálie:

- ◆ Esej pro SNP ID rs1048771 (RAD54L), rs861539 (XRCC3) – C__7567494_10, C__8901525_10 (Applied Biosystems).
- ◆ PCR Master Mix – TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems).
- ◆ Sterilní destilovaná voda Milli-Q.

Laboratorní plasty, laboratorní sklo:

Mikrotitrační 96 - jamkové destičky, ochranné folie pro mikrotitrační destičky a běžné laboratorní sklo.

Přístrojové vybavení:

NanoDrop ACT Gene ASP-3700, PCR box, Real-time PCR Thermal Cycler – Applied Biosystems 7500 Fast, softwarový program Real Time 7500, centrifuga, multikanálová pipeta a běžné vybavení laboratoře.

5. METODIKA

5.1. Test senzitivity k bleomycinu

Kultivace fytohemaglutininem stimulovaných PBL a indukce CHT zlomů pomocí BLM byla provedena podle původního protokolu (Hsu *et al.*, 1989). Od každého dárce bylo odebráno 5 ml periferní venózní krve do sterilních heparinizovaných zkumavek. Krev byla skladována při 4°C a vždy užita ke kultivaci do 48h po odběru. Od každého pacienta nebo zdravé osoby byly založeny dvě kultury, k jedné z nich byl na posledních 5h kultivace přidán BLM. Druhá kultura bez BLM sloužila jako kontrolní. Průběh zpracování byl pro obě skupiny s výjimkou přidání BLM totožný.

Zásobní roztok BLM byl připraven rozpuštěním BLM v destilované vodě k dosažení koncentrace 150 µg/ml. Následně byl roztok rozpipetován do zkumavek Eppendorf a skladován při teplotě -20°C.

5.1.1. Kultivace lidských periferních lymfocytů

Pro kultivaci PBL bylo použito kompletní medium s fytohemaglutininem. Ke 4,5 ml rozmraženého kompletního média jsme přidali 0,5 ml heparinizované krve. Vzorke jsme kultivovali v termostatu při 37°C po dobu 67h v šikmé poloze. Po 67h jsme vždy k jednomu ze dvou vzorků od každého jedince přidali BLM á 50 µl tak, aby byla jeho výsledná koncentrace v každé zkumavce 30 µl/ml. BLM byl tak přidán na posledních 5h kultivace. Na poslední dvě hodiny 72h kultivace jsme ke všem vzorkům přidali 0,3 ml zásobního roztoku kolchicinu, zkumavky jsme mírně protřepali a dali zpět do 37°C na 2h.

5.1.2. Příprava cytogenetických preparátů

1. Po uplynutí 72h od začátku celé kultivace jsme buňky centrifugovali 10 min při 2000 RPM. Následně jsme supernatant ze všech zkumavek odstranili a sediment resuspendovali za stálého protřepávání Pasteurovou pipetou v 10 ml 0,075 M KCl předehřátém na 37°C. Při přidávání hypotonického roztoku KCl jsme dbali na jeho důkladné promísení se sedimentem (v průběhu hypotonizace dojde k prasknutí cytoplazmatické membrány buňky a rozptřeni chromozómů uvnitř jader). Resuspendovaný sediment jsme přenesli na 15 minut zpět do termostatu temperovaného na 37°C.
2. *Předfixace*: Připravili jsme si fixační roztok ze směsi metanolu a ledové kyseliny octové

ve výsledném poměru 3:1. Ke každé kultuře jsme přidali 15 kapek vychlazeného fixačního roztoku a nechali stát při pokojové teplotě 5 min (v průběhu fixace dojde k okamžitému zhnědnutí resuspendovaných sedimentů, rozpadlými produkty hemoglobinu). Poté jsme vzorky centrifugovali 10 min při 2000 RPM.

3. *Fixace*: Vzorky jsme vždy centrifugovali 10 min při 2000 RPM, ovšem v jednotlivých krocích jsme přidávali stále menší objem fixačního roztoku podle následujícího postupu (fixaci jsme opakovali celkem třikrát):Přidali jsme přibližně 7 ml fixačního roztoku za stálého mísení Pasteurovou pipetou a poté centrifugovali 10 min při 2000 RPM. Supernatant jsme po centrifugaci okamžitě opatrně odstranili. K sedimentu jsme Pasteurovou pipetou za stálého mísení přidali přibližně 5 ml fixačního roztoku a opakovali centrifugaci po dobu 10 min při 2000 RPM.
 - ◆ Supernatant jsme opět odstranili a přidali přibližně 3 ml fixačního roztoku za stálého mísení Pasteurovou pipetou. Zkumavky jsme centrifugovali 10 min při 2000 RPM.
 - ◆ Po provedení poslední fixace a následné centrifugaci jsme většinu supernatantu odstranili, přičemž jsme společně se sedimentem ve zkumavce nechali přibližně 2 kapky supernatantu. Sediment jsme resuspendovali a podle hustoty přidali Pasteurovou pipetou 1-2 kapky fixačního roztoku a 1 kapku kyseliny octové.
 - ◆ Výsledný roztok jsme kapali Pasteurovou pipetou na vychlazená podložní skla
 - ◆ z výšky přibližně 40 cm. Z každého vzorku jsme takto vytvořili optimálně pět cytogenetických preparátů, osušili na předem vytemperované plotně a mikroskopicky zkontrolovali hustotu buněk a rozložení mitóz v nativním preparátu malým zvětšením (100x). Pokud byla hustota nativního preparátu příliš vysoká, naředili jsme ještě sediment přidáním další kapky fixačního roztoku.
4. *Barvení*: Po důkladném oschnutí preparátů (nejdříve druhý den) jsme skla ponořili na 1 min do metanolu a následně opět usušili. Připravili jsme si 100 ml roztoku Giemsy. K 94 ml Sörensenova fosfátového pufru jsme přidali 6 ml Giemsy a vzniklý roztok jsme nalili do vysoké histologické kyvety. Preparáty jsme barvili po dobu 6 min, poté opláchli tekoucí vodou.

5.1.3. Hodnocení cytogenetických preparátů

Pod světelným mikroskopem s 1000x zvětšením bylo hodnoceno z každého vzorku sto buněk v metafázi buněčného dělení, tedy od každého jedince bylo hodnoceno sto buněk kultury vystavené BLM a sto buněk kontrolní kultury bez BLM. Hodnotili jsme buňky s počtem chromozómů 46 ± 1 . Pro minimalizaci subjektivní chyby každý vzorek hodnotili dva nezávislí pozorovatele (každý padesát

metafází z jednoho cytogenetického preparátu). Buňky se špatně rozloženými chromozómy či poškozené preparáty nebyly hodnoceny.

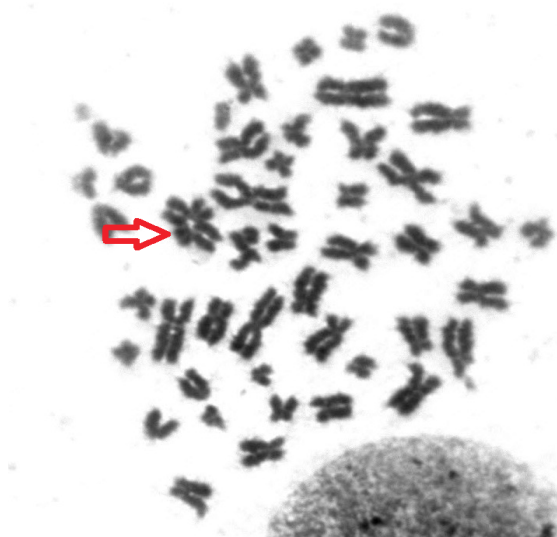
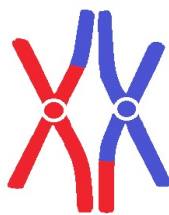
Průběh hodnocení cytogenetických preparátů

Vyhledání mitózy v mikroskopu při malém zvětšení (objektiv 10x), spočítání chromozómů při zvětšení 1000x, zaznamenání souřadnic metafáze, počtu chromozómů, počtu CHT zlomů a eventuálně dalších aberací jako např.: CHT výměn, achromatidových lézí, dicentrických chromozómů, prstencových chromozómů (ringů) eventuálně s difragmenty, intersticiálních delecí, terminálních delecí, abnormálních chromozómů a pulverizací dle následujících kritérií (Au a Salama, 2006):

- Chromativové aberace

Chromatidové zlomy: představují přerušení jedné chromatidy, které je větší než její průměr. V opačném případě se jedná o achromatidové léze. V případě CHT zlomu je zlomené raménko v blízkosti postiženého chromozómu. K této abnormalitě dochází při vytvoření DSB po replikaci DNA.

Chromatidové výměny: představují propojení či výměnu částí chromatid dvou chromozómů. Protože je zahrnuta pouze jedna chromatida každého ze dvou chromozómů, jsou výměny cytogeneticky hodnoceny jako dva CHT zlomy.

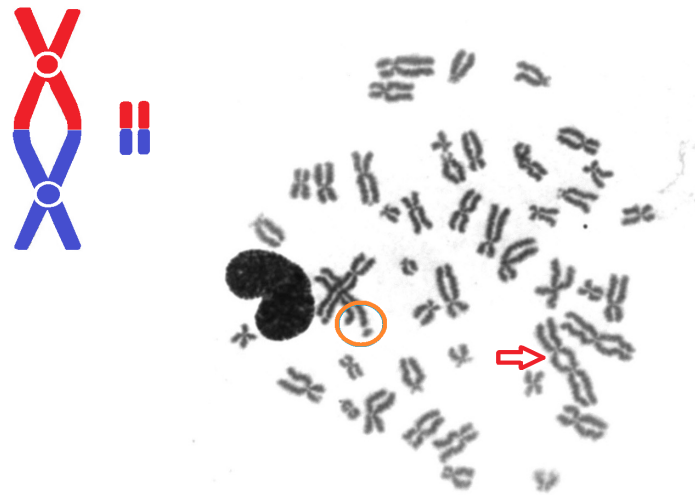


Obr. 13: Chromatidová výměna.

Vlevo je schéma chromatidové výměny a vpravo chromozómy v metafázi buněčného dělení s vyznačenou chromatidovou výměnou.

- Chromozómové aberace

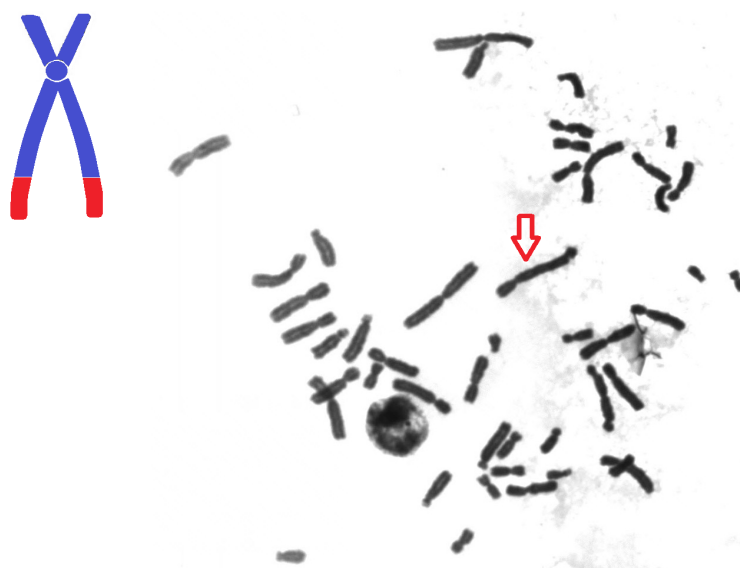
Dicentrické chromozómy: jedná se o charakteristickou aberaci vznikající po expozici ionizujícím záření, kdy jsou PBL ozářeny v G0 fázi a buňka poté projde replikací DNA. Dicentrický chromozóm vzniká spojením zlomených konců obou chromatid dvou chromozómů. Odlomené fragmenty dvou chromozómů bez centromery tvoří difragment.



Obr. 13: Dicentrický chromozóm.

Vlevo je schéma dicentrického chromozómu s difragmentem, vpravo je buňka v metafázi buněčného dělení, obsahující CHTA i CHSA. Šipkou je poukázáno na dicentrický chromozóm bez difragmentu (CHSA), CHT zlom je zakroužkován.

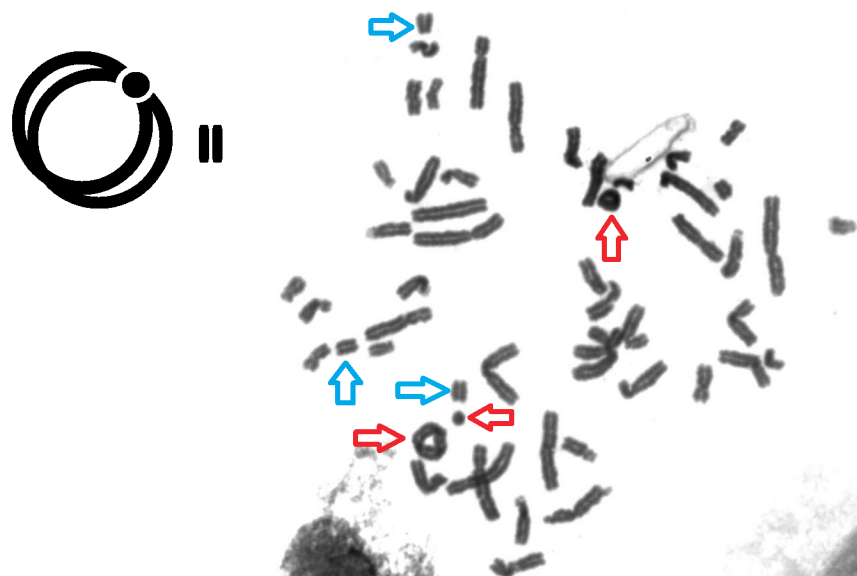
Abnormální chromozómy: jsou chromozómy abnormálního tvaru nebo velikosti. Jsou důsledkem delecí, translokací nebo inverzí



Obr. 14: Schéma abnormálního chromozómu.

Vlevo je schéma abnormálního chromozómu a vpravo buňku s vyznačeným abnormálním chromozómem, který zároveň obsahuje CHT zlom raménka q.

Prstěncové chromozómy: Vznikají spojením zlomených konců obou ramen jednoho chromozómu. Odlomené části chromatid mohou tvořit difragment.



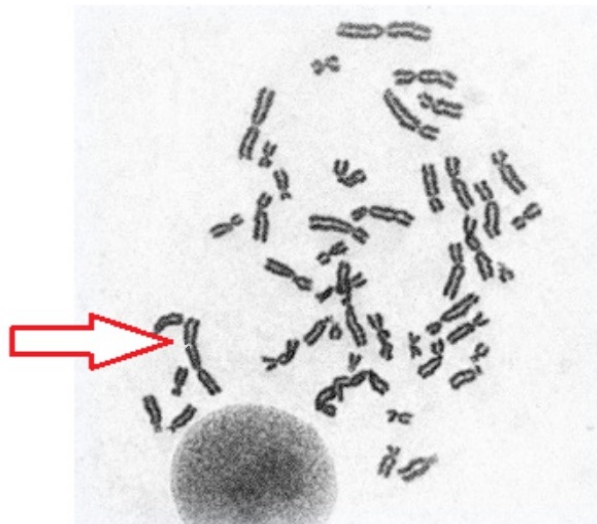
Obr. 15: Schéma prstěncového chromozómu s difragmentem.

Vpravo jsou chromozómy v metafázi buněčného dělení, kde červené šipky vyznačují tři prstěncové chromozomy a modré šipky příklady difragmentů.

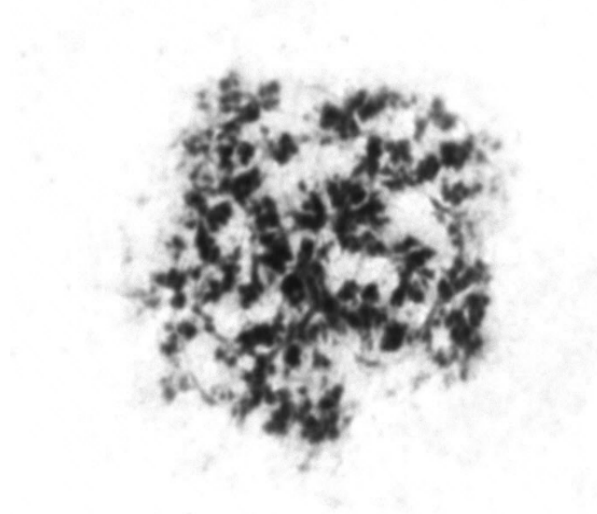
- Ostatní aberace chromozómů

Achromatidové léze (gapy) jsou definovány jako „neobarvené části chromatinu, které nenarušují jeho integritu“ (Savage, 2004). V současné době se častěji používá pojem „achromatidová léze“, protože ve skutečnosti nedochází mezi částmi chromatid k přímému přerušení, což termín „gap“ naznačuje. Tyto léze nejsou počítány do celkového počtu aberací a jsou uváděny zvlášť (Obr. 15; Revell, 1974).

Pulverizace: Buňky s pulverizací byly pozorovány jako defragmentované struktury DNA, u kterých nebylo možné rozpoznat strukturu chromozómů. Narušená integrita DNA po expozici BLM může být příčinou naprosté ztráty struktury chromozómů (Obr. 16)



Obr. 15: Schéma achromatidové léze a buňka v metafázi s vyznačenou lézí.



Obr. 16: Pulverizace.

Výsledek hodnocení každého vzorku byl vyjádřen jako celkový počet aberantních buněk a počet CHT zlomů na buňku, přičemž celkový počet zlomů byl součtem chromatidových zlomů, izochromatidových zlomů, které byly počítány jako dva zlomy, a chromatidových výměn, také počítaných jako dva zlomy. Počet zlomů v buňkách s dvanácti a více zlomy byl počítán jako dvanáct, a počty takovýchto silně poškozených buněk byly zaznamenány. Do hodnocení nebyly zahrnuty buňky s pulverizací (rozpadem chromozómů). CHSA a achromatidové léze byly zaznamenány zvlášť.

5.2. Stanovení polymorfismů

5.2.1. Izolace DNA z periferní krve

DNA byla izolována z periferní krve použitím fenol-chloroformové extrakční metody (Chomczynski a Sacchi, 1987). Pět vzorků krve z celé skupiny bylo odebráno do heparinu (K4, K5, K6, K755, K757), a proto bylo nutné odstranit jeho inhibiční efekt pomocí enzymu Heparinázy I. (Taylor AC. *et al.*, 1997). Ostatní odběry byly provedeny do zkumavek s EDTA a skladovány při -20°C.

Postup izolace DNA z krevních odběrů do zkumavek s EDTA

1. Periferní krev jsme nechali rozmrznout při laboratorní teplotě a následně přelili do kónických zkumavek o objemu 15ml. Objem krve jsme doplnili 1 mM roztokem $MgCl_2$ ve 20 mM Tris-HCl na výsledný objem 14 ml.
2. Zkumavky jsme centrifugovali 15 min při laboratorní teplotě a 3500 RPM.
3. Supernatant jsme opatrně odstranili pipetou, ale ve zkumavce jsme ponechali 1 ml směsi sedimentu a supernatantu. Opakovali jsme doplnění stočené krve 1 mM $MgCl_2$ ve 20 mM TRIS-HCl na výsledný objem 14 ml. Zkumavky jsme opět centrifugovali 15 min při 3500 RPM.
4. Krok 3 jsme opakovali ještě jednou. Sediment jsme následně resuspendovali v 1 ml lyzačního roztoku a přepipetovali do zkumavek Eppendorf o objemu 1,5 ml.
5. Zkumavky jsme poté třepali 5 min na třepáče. Supernatant jsme dokonale odstranili a resuspendovali ve 400 μ l sterilní destilované vody. Zkumavky jsme opět třepali 2 min.
6. Zkumavky jsme přenesli do centrifugy a centrifugovali při laboratorní teplotě a 13 600 RPM po dobu 5 min. Supernatant jsme odstranili a resuspendovali v 80 μ l pufru pro proteinázu K. K roztoku jsme přidali 10 μ l 10% roztoku SDS, 100 μ l 5 M NaCl a 240 μ l destilované sterilní vody a třepali 5 min.
7. Poté jsme přidali 300 μ l směsi fenol:chloroform:izoamyl alkohol a protřepávali 4 min. Zkumavky jsme centrifugovali 5 min při 13 600 RPM.
8. Vrchní čirou fází jsme opatrně odebrali pomocí pipety do nové zkumavky Eppendorf. Dbali jsme především na to, aby nedošlo zároveň k odebrání mezivrstvy, která je tvořena bílkovinami. K horní fázi jsme přidali 400 μ l 96% vychlazeného etanolu a poté jsme zkumavky otáčeli než došlo k precipitaci viditelných vláken DNA.

9. Zkumavky jsme centrifugovali 5 min při 13 600 RPM a při 4°C. Supernatant jsme opatrně odstranili a k sedimentu jsme přidali 1,5 ml 70% etanolu. Opět jsme zkumavky centrifugovali 5 min při 13 600 RPM a 4°C.
10. Pipetou jsme odstranili etanol a zkumavky s DNA jsme nechali vysušit při laboratorní teplotě přes noc.
11. DNA jsme rozpustili ve 50 µl sterilní destilované vody a uložili přes noc v lednici při 4°C. Následující den jsme vzorky zamrazili na teplotu -20°C.

I přes opakování izolace se nepodařilo získat DNA v odpovídajícím množství a kvalitě u následujících vzorků: 792, K2, K16, K17, K18, K19, K20, K30, K64.

Odstranění inhibičního efektu heparinu pomocí Heparinázy I

Izolace DNA u odběrů s heparinem byla shodná s předchozím postupem pro odběry do EDTA (body 1-11), avšak před samotným zmrazením vzorků na -20°C bylo nutné odstranit inhibiční efekt heparinu, což jsme provedli následovně:

1. Pomocí NanoDropu ACT Gene ASP-3700 jsme změřili obsah DNA v jednotlivých vzorcích a podle koncentrace jsme připravili reakční směsi obsahující vždy: 300 ng DNA; 1 mM Tris (pH=8,0)/ 1 mM EDTA; 5 µl enzymu Heparinázy I. (0,075 units).
2. Celkový objem reakční směsi byl 20 µl. Následná inkubace s enzymem trvala 2h při laboratorní teplotě. Z reakční směsi jsme použili 0,6 µl pro Real-time PCR (RT-PCR), což odpovídalo koncentraci DNA 10 ng.

Postup ředění vzorků DNA (EDTA)

Pro případné opakování RT-PCR bylo nutné izolované vzorky DNA naředit na stejný objem (25 µl) a koncentraci (50 ng/µl), což jsme provedli podle následujícího postupu:

Vzorky DNA rozpuštěné v 50 µl sterilní destilované vody jsme rozmrazili, změřili jsme jejich koncentraci pomocí spektrofotometru NanoDrop ACT Gene ASP-3700, vypočítali jsme potřebný objem DNA a rozpouštědla (sterilní destilovaná voda) a do zkumavek Eppendorf jsme každý vzorek nařadili na výsledný objem 25 µl a koncentraci DNA 50 ng/µl. Z takto připravených vzorků jsme řadili potřebnou koncentraci pro RT-PCR.

Postup ředění vzorků DNA pro RT-PCR

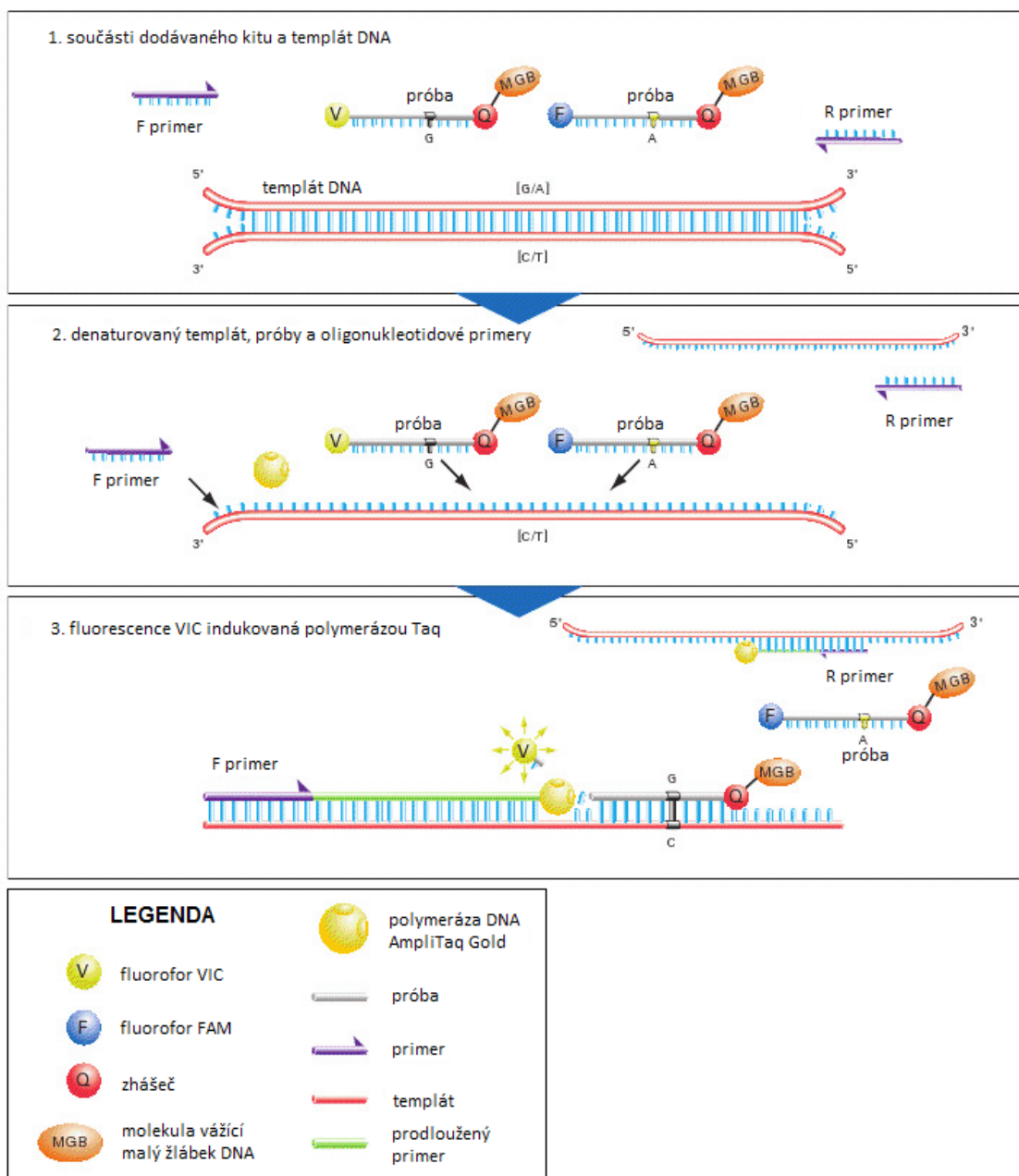
Potřebná koncentrace DNA pro RT-PCR byla 10 ng/μl. Připravené vzorky o koncentraci DNA 50ng/μl a objemu 25μl jsme proto naředili 5x sterilní destilovanou vodou do mikrotitračních 96 - jamkových destiček na celkový objem 30μl. Objem pipetované DNA o koncentraci 50 ng/μl byl v každé jamce 6 μl a objem pipetované sterilní destilované vody byl 24 μl. Mikrotitrační destičku jsme přelepili folií.

5.2.2. Alelická diskriminační analýza

Pro genotypizaci kandidátních genů opravné dráhy HR (XRCC3 a RAD54L) jsme použili tzv. „Alelickou diskriminační metodu TaqMan®“.

Princip alelické diskriminační metody TaqMan®

Genotypizační assay obsahuje oligonukleotidové primery pro amplifikaci polymorfni sekvence a značené próby pro rozlišení mezi oběma sekvencemi s SNP v DNA. K 5' konci obou prób je kovaletně připojen fluorofor (FAM; 6-carboxyfluorescein nebo VIC) a na 3' konci zhášec. Pokud jsou fluorofor a zhášec v bezprostřední blízkosti, nedojde k fluorescence. V každém cyklu RT-PCR se próby podle své specifity naváží do oblasti cílové polymorfni sekvence. Zároveň dojde k nasednutí primerů a syntéze DNA. Pokud Taq polymeráza narazí v průběhu syntézy nově vznikajícího vlákna na označené sondy, spustí svou exonukleázovou aktivitou ve směru od 5' k 3' konci. Dojde tak k oddělení zhášce od fluoroforu a je detekována fluorescence (TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol 2006, Applied Biosystems).



Obr. 17: Alelické diskriminační metody TaqMan®.

Přepřacováno z: (TaqMan SNP Genotyping Assays Protocol 2006, Applied Biosystems).

Gen	SNP cluster ID	Ancestrální alela	Variantní alela	Změna kodónu	Záměna aminokyselinového zbytku
XRCC3	rs861539	C	T	ACT - ATG	241 T [Thr]⇒M [Met] (mutace missense)
RAD54L	rs1048771	C	T	GCC - GCT	730 A [Ala]⇒A [Ala] (mutace silent)

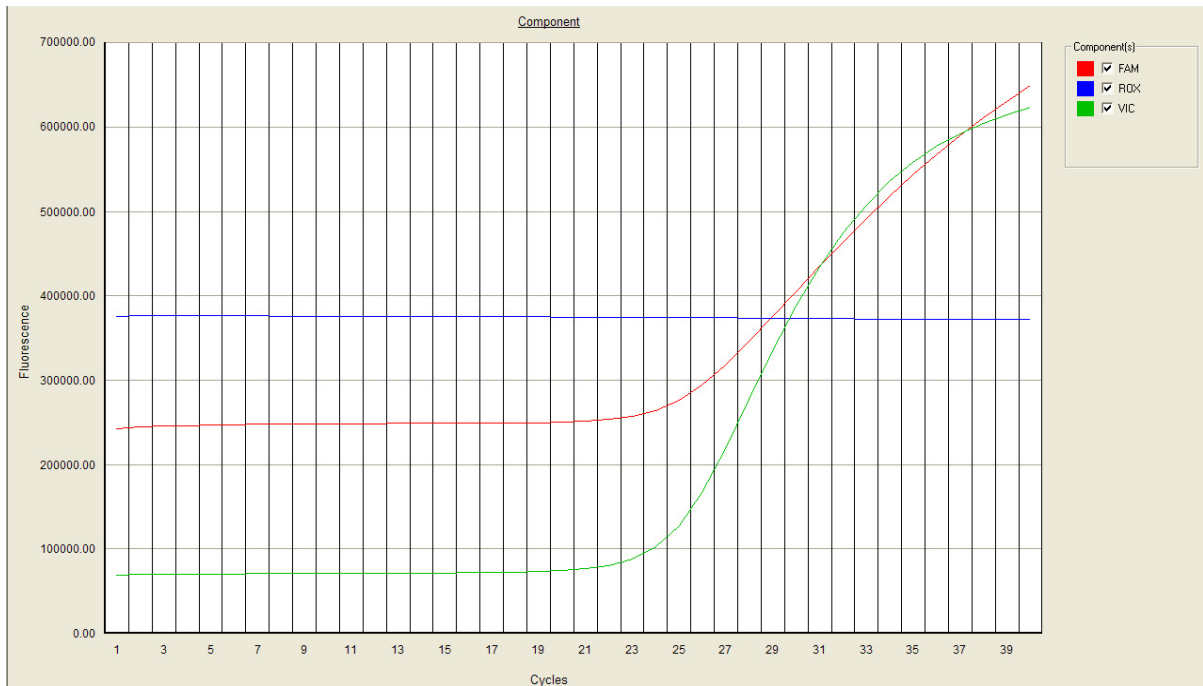
Tab. 4: Charakteristika SNP studovaných genů.

Postup alelické diskriminace

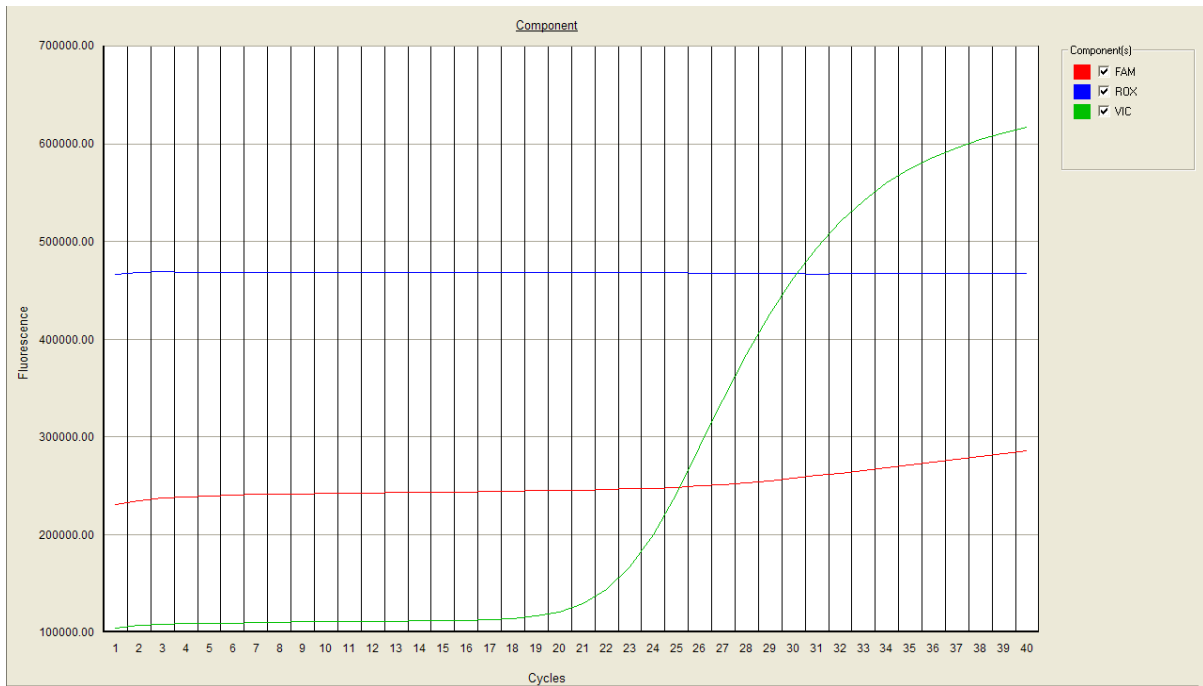
1. V PCR boxu jsme protřepali a krátce stočili eseje pro geny RAD54L a XRCC3 (Applied Biosystems; SNP ID rs3218536, SNP ID rs861539).
2. Do dvou označených zkumavek Eppendorf jsme pipetovali 1000 μ l PCR Master Mixu (Applied Biosystems TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix) a poté přidali 25 μ l eseje pro jednotlivé geny. Dostali jsme tak 20x zředěné roztoky pro obě eseje, které měly celkový objem potřebný pro 96 jamek jedné mikrotitrační destičky.
3. Označili jsme si dvě mikrotitrační destičky a pipetovali do každé z 96 jamek (s výjimkou první jamky) 9 μ l 20x naředěné eseje pomocí multikanálové pipety. Do první jamky jsme pipetovali 10 μ l sterilní destilované vody, která sloužila jako kontrolní, tzv. „Non template control“ (NTC).
4. Do jednotlivých jamek dvou mikrotitračních destiček s rozdílnou esejí jsme pipetovali 8 μ l naředěných vzorků DNA o koncentraci 10 ng/ μ l.
5. Takto připravené mikrotitrační destičky jsme přelepili ochrannou folií a stočili na centrifuze při 1000 RPM po dobu 1 min při laboratorní teplotě.
6. Mikrotitrační destičku jsme vložili do RT-PCR Thermal Cycleru (Applied Biosystems 7500 Fast).
7. V softwarovém programu Real Time 7500 jsme nastavili kroky pro alelickou diskriminaci: 1. pre-read, 2. krok amplifikace a 3. post-read. Následně jsme přiřadili barevné označení pro variantní a divokou alelu.
8. Nastavili jsme teplotu a dobu trvání kroků každého cyklu RT-PCR. Amplifikační část zahrnovala 40 cyklů, přičemž první krok trval 10 min při 95°C, druhý krok 15s při 92°C a třetí krok 1 min při 60°C.
9. Vyhodnotili jsme amplifikaci DNA pomocí funkce post-read v programu Real Time 7500.

Nepodařila se amplifikace DNA u vzorků s označením: K2, K4, K5, K6, K30, K64, K755, K757 a 792. Výčet neamplifikovaných vzorků DNA v průběhu PCR zahrnuje všech pět odběrů provedených do heparinu. To naznačuje, že inhibiční efekt heparinu se nám nepodařilo pomocí enzymu odstranit, protože koncentrace izolované DNA před samotným zahájením PCR byla dostatečná pro amplifikaci. U ostatních neamplifikovaných vzorků byla koncentrace izolované DNA velmi nízká (rozptyl 2,1 – 7 ng/ μ l).

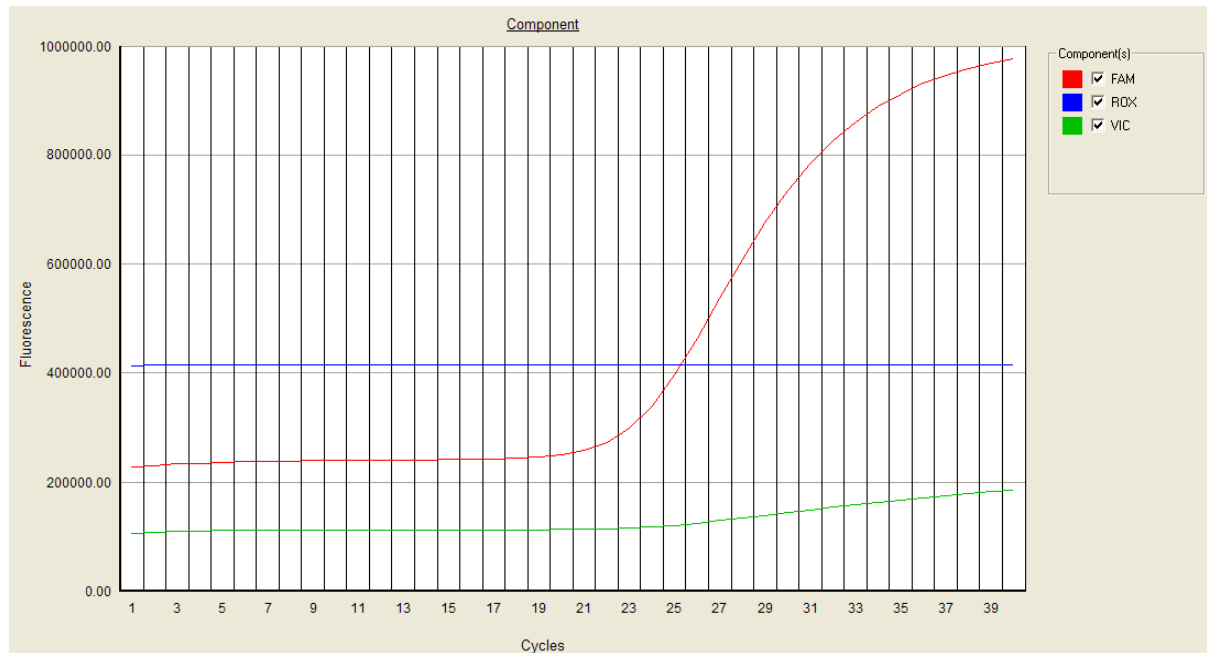
Obr. 18: Ukázka naměřené fluorescence značených práb v průběhu RT-PCR.



1. Došlo k nárůstu fluorescence u obou značených práb. Jedná se o heterozygotní stav.



2. Došlo k nárůstu fluorescence pouze u divoké alely (značené VIC) genu XRCC3, rs861539.



3. Ukázka naměřené fluorescence v případě amplifikace variantní alely (značené FAM) genu RAD54L, rs1048771.

5.2.3. Statistické hodnocení

Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí software SPSS verze 16 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Obdržené výsledky byly hodnoceny deskriptivní statistikou a vyjádřeny jednak formou průměru±směrodatné odchylky, jednak formou mediánu a rozptylu. Vzhledem k nerovnoměrnému rozložení dat souboru jsme pro porovnávání veličin ve skupinách použili neparametrické testy (Mann-Whitney U-test, Kruskal-Wallis test). Vztah mezi kontinuálními proměnnými byl testován Spearmanovou analýzou. Vztah mezi genotypy a CHT zlomy na buňku byl hodnocen porovnáním průměrů a analýzou rozptylu (ANOVA). Hodnota $p < 0.05$ byla považována za ukazatel statisticky významného rozdílu.

6. VÝSLEDKY

6.1. Test indukce aberací bleomycinem

V průběhu celého projektu jsme u každého vzorku (n=200) cytogeneticky zhodnotili 100 buněk v metafázi, což odpovídalo celkovému počtu 20 000 buněk a přibližně 920 000 chromozómů. Ve skupině nádorových pacientů i zdravých osob jsme sledovali následující parametry: hladinu aberantních buněk s CHT zlomy, hodnotu CHT zlomů v jedné buňce (CHT zlomy/b) a ostatní CHA po expozici buněk BLM i bez tohoto působení. Míra chromozomálního poškození byla vztažena k pohlaví, věku, kouření a v případě skupiny pacientů také k DG. U všech pacientů a zdravých osob byla mimo CHT zlomů sledována také hladina CHSA, abychom vyloučili předchozí protinádorovou terapii nebo vystavení genotoxickému působení před odběrem periferní krve, což by ovlivnilo celkovou hladinu aberací.

PBL skupiny osob (n jedinců)	Označení
PBL pacientů po expozici BLM (n=50)	PB
PBL pacientů bez vystavení BLM (n=50)	P0
PBL zdravých osob po expozici BLM (n=50)	ZB
PBL zdravých osob bez vystavení BLM (n=50)	Z0

Tab. 5: Pro přehlednost výsledků uvádíme zkratky místo PBL skupiny pacientů a zdravých osob bez BLM a zároveň po této expozici.

6.1.1. Souhrnné výsledky cytogenetického hodnocení

Ze souhrnných výsledků cytogenetického hodnocení je patrné, že PB obsahují 110x více CHT zlomů než P0. Oproti tomu BLM u ZB zvýšil počet těchto aberací 92x ve srovnání se Z0. Podobný trend lze pozorovat i v případě achromatidových lézí. Hladina ostatních aberací, především dicentrických chromozómů, se téměř nelišila při expozici buněk BLM i bez působení tohoto radiomimetika. Tato zjištění dokládají, že BLM přidaný na posledních pět hodin kultivace nemá na indukci CHSA žádný vliv. Z ostatních cytogeneticky hodnocených poškození se pouze pulverizace vyskytovala výhradně ve vzorcích vystavených působení BLM (*Tab. 6 a 7*). Zjištěné hladiny aberací v PBL neexponovaných BLM (P0 a Z0) sloužily pouze jako referenční (kontrolní) pro obě skupiny vzorků s přidaným BLM (PB a ZB).

+ BLM	n buněk	CHTA		CHSA						Achromatidové léze		Pulverizace	
		Zlom	Výměna	Delece		Dicentrický chromozóm		Prstěncový chromozóm	Abnormální chromozóm	Izochromatidový zlom	Gap		Izochromatidový gap
				ID	TD	- f	+ f						
PB (n=50)	5000	6928	6 ^a	13	8	1	4	0	4	12	1197	3 ^b	7
ZB (n=50)	5000	7280	9 ^a	4	16	6	5	2	5	18	1396	2 ^b	6

- BLM	n buněk	CHTA		CHSA						Achromatidové léze		Pulverizace	
		Zlom	Výměna	Delece		Dicentrický chromozóm		Prstěncový chromozóm	Abnormální chromozóm	Izochromatidový zlom	Gap		Izochromatidový gap
				ID	TD	- f	+ f						
P0 (n=50)	5000	63	0	3	14	7	2	1	3	0	66	0	0
Z0 (n=50)	5000	79	1 ^a	1	7	6	5	1	1	2	78	0	0

Tab. 6 a 7: Souhrnné výsledky cytogenetického hodnocení.

Legenda:

ID=intersticiální delece, TD=terminální delece, - f=dicentrický chromozóm bez difragmentu, + f=dicentrický chromozóm s difragmentem.

^a Výměny (=2 zlomy) jsou započítány do celkového počtu zlomů.

^b Izochromatidový gap (=2 gapy) je započítán do celkového počtu gapů.

Skupina osob	PB (n=50)	P0 (n=50)	ZB (n=50)	Z0 (n=50)
Věk (roky)	60 (Me=61,5, 34-85)		68 (Me=64, 16-91)	
Pohlaví (M/F; %)	(22/78)		(42/58)	
% kuřáků ^c	56		44	
% všech aber. buněk	48,6±9,7 (Me=47; 31-69)	1,68±1,49 (Me=1,5; 0-8)	50,8±9,7 (Me=53,0; 31-69)	1,90±1,58 (Me=2,0; 0-7)
% buněk s CHT zlomy	48,5±9,6 (Me=46; 31-69)	1,26±1,40 (Me=1,0; 0-7)	50,4±9,8 (Me=52,0; 31-69)	1,58 ±1,36 (Me=1,0; 0-5)
CHT zlomy/b	1,39±0,41 (Me=1,32; 0,72-2,56)	0,01±0,01 (Me=0,01; 0-0,07)	1,46±0,40 (Me=1,48; 0,78-2,38)	0,02±0,01 (Me=0,01; 0-0,05)
Gapy/b	0,24	0,013	0,28	0,016

Tab. 8: Anamnestické údaje a souhrnné výsledky cytogenetického hodnocení.

Kromě věku, pohlaví a procenta kuřáků jsou uváděné hodnoty vždy průměrem pro danou skupinu.

^c součet procenta kuřáků, kteří přestali kouřit před méně než pěti lety a těch, kteří kouřili v době zjišťování anamnestických údajů

6.1.2. Statistické porovnání aberantních buněk v jednotlivých skupinách

+ BLM	PB (n=50)	ZB (n=50)	p
Průměrné procento aberantních buněk s CHT zlomy	48,5±9,6 (Me=46; 31-69)	50,4±9,8 (Me=52,0; 31-69)	0,332
Průměrné procento všech aberantních buněk (CHT zlomy a CHSA)	48,6±9,7 (Me=47; 31-69)	50,8±9,7 (Me=53,0; 31-69)	0,279

Tab. 9: Statistické porovnání průměrného procenta aberantních buněk s CHT zlomy a průměrného procenta všech aberantních buněk po působení BLM u pacientů a zdravých osob.

- BLM	P0 (n=50)	Z0 (n=50)	p
Průměrné procento aberantních buněk s CHT zlomy	1,26±1,40 (Me=1,0; 0-7)	1,58±1,36 (Me=1,0; 0-5)	0,172
Průměrné procento všech aberantních buněk (CHT zlomy a CHSA)	1,68±1,49 (Me=1,5; 0-8)	1,90±1,58 (Me=2,0; 0-7)	0,428
p	0,076	0,596	

Tab. 10: Statistické porovnání průměrného procenta aberantních buněk s CHT zlomy a průměrného procenta všech aberantních buněk bez expozice PBL BLM u pacientů a zdravých osob.

Aberantní buňky pouze s CHT zlomy

Průměrné procento aberantních buněk s CHT zlomy (tedy buněk s CHT zlomy včetně chromatidových výměn) ve skupině Z0 bylo $1,58 \pm 1,36$ (Me=1,0; 0-5). Po vystavení buněk BLM jsme u ZB zjistili mnohonásobně vyšší průměrné procento aberantních buněk s CHT zlomy, tj. $50,4 \pm 9,8$ (Me=52,0; 31-69). Ve skupině pacientů bylo procento aberantních buněk nižší v obou případech (PB a P0). Průměrné procento aberantních buněk s CHT zlomy u skupiny P0 bylo $1,26 \pm 1,40$ (Me=1,0; 0-7), po indukci BLM (PB) pak $48,5 \pm 9,6$ (Me=46; 31-69). Rozdíl mezi průměrným procentem aberantních buněk s CHT zlomy u P0 a Z0 ($p=0,172$) i u PB a ZB ($p=0,332$) však nebyl statisticky významný (Tab. 9 a 10).

Všechny aberantní buňky (s CHT zlomy a CHSA)

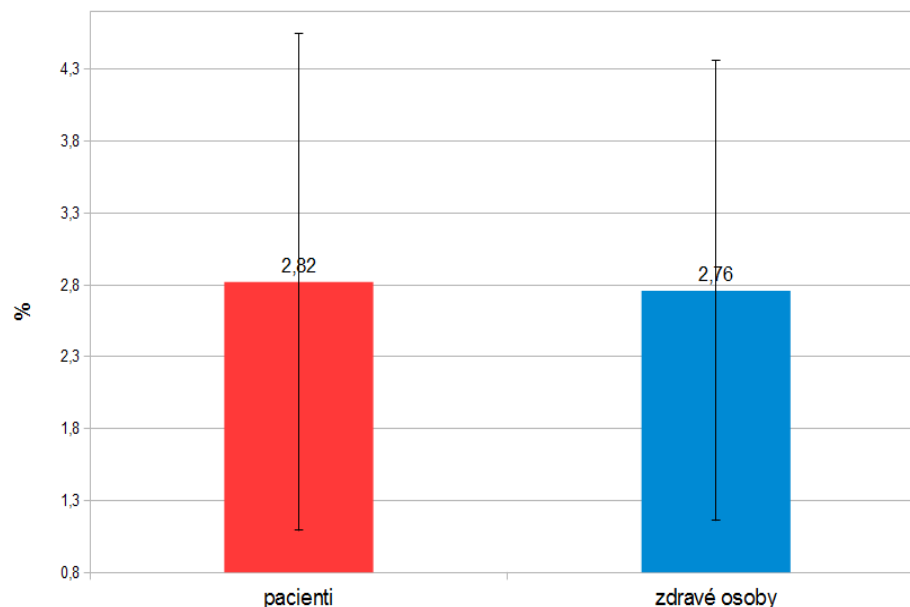
Průměrné procento všech aberantních buněk, zahrnující CHT zlomy a CHSA, bylo u Z0 $1,90 \pm 1,58$ (Me=2,0; 0-7), po ovlivnění BLM (ZB) pak $50,8 \pm 9,7$ (Me=53,0; 31-69). Průměrné procento všech aberantních buněk u P0 bylo $1,68 \pm 1,49$ (Me=1,5; 0-8), po ovlivnění BLM $48,6 \pm 9,7$ (Me=47; 31-69). Rozdíl mezi průměrným procentem všech aberantních buněk, tedy s CHT zlomy a CHSA u skupiny P0 a Z0 ($p=0,428$) i u PB a ZB ($p=0,279$) nebyl statisticky významný (Tab. 9, 10).

Aberantní buňky s CHT zlomy/ všechny aberantní buňky

Průměrné procento aberantních buněk pouze s CHT zlomy a průměrné procento všech aberantních buněk (s CHT zlomy i CHSA) jsme porovnali neparametrickým Mann-Whitney U-testem. Výsledek této analýzy nebyl u skupiny Z0 statisticky významný ($p=0,596$). Na hranici signifikance byl výsledek porovnání průměrného procenta buněk s CHT zlomy a průměrného procenta všech aberantních buněk u P0 ($p=0,076$). Tuto analýzu nebylo nutné provádět u PBL exponovaných BLM, protože nebyl zjištěn významný rozdíl mezi získaným (CHSA) a v průběhu kultivace indukovaným (CHT zlomy) chromozomálním poškozením u skupin P0 a Z0.

Aberantní buňky s ≥ 12 CHT zlomy

Průměrné procento buněk s ≥ 12 CHT zlomy (Graf 1) bylo u PB $2,82 \pm 1,73$ a u ZB $2,76 \pm 1,60$. Pro porovnání rozdílů mezi oběma skupinami (PB a ZB) jsme použili Mann-Whitney U-test, který neprokázal signifikantní rozdíl ($p=0,997$).



Graf 1: Průměrné procento aberantních buněk s ≥ 12 CHT zlomy u skupin PB a ZB.

Aberantní buňky s CHT zlomy a diagnóza pacientů

Průměrné procento aberantních buněk s CHT zlomy u jednotlivých DG pacientů jsme nejdříve testovali základní popisnou statistikou (průměr, medián, rozptyl). Největší skupina pacientů s DG BRCA ($n=24$) měla v buňkách neovlivněných BLM průměrné procento aberantních buněk s CHT zlomy $1,58 \pm 1,79$ ($Me=1,0$; 0-7), skupina pacientů s maligním nádorovým onemocněním trávicí trubice a zažívacích orgánů ($n=18$) $1,00 \pm 0,97$ ($Me=1,0$; 0-3) a skupina pacientů s nádory urogenitálního systému pak ($n=8$) $0,88 \pm 0,35$ ($Me=1,0$; 0-1). Po přidání BLM k PBL měla skupina s DG BRCA průměrně $47,79 \pm 8,32$ ($Me=45,50$; 35-63) procent aberantních buněk s CHT zlomy, skupina s nádory trávicí trubice a zažívacích orgánů $49 \pm 11,59$ ($Me=48,0$; 31-69) a skupina pacientů s nádory urogenitálního systému $49,25 \pm 9,29$ ($Me=45,50$; 36-63).

Průměrné procento aberantních buněk s CHT zlomy u pacientů různých DG jsme porovnali neparametrickým Mann-Whitney U-testem. Byly společně srovnány vždy dvě diagnózy. Při porovnání průměrného procenta buněk s CHT zlomy u pacientů s DG BRCA a u pacientů s DG UGC nebyl prokázán signifikantní rozdíl ve vzorcích bez ovlivnění BLM ($p=0,617$) ani po působení BLM ($p=0,616$). Stejným testem jsme porovnali pacienty s DG BRCA společně s pacienty s DG CRC. Ani v tomto případě nebyl prokázán signifikantní rozdíl u pacientů s příslušnými DG, a to bez ohledu na absenci ($p=0,42$) či přítomnost ($p=0,712$) BLM. Srovnali jsme také průměrné procento aberantních buněk s CHT zlomy u pacientů s DG CRC a DG UGC, kdy nebyl prokázán signifikantní rozdíl bez radiomimetického působení BLM ($p=0,905$) ani po expozici PBL BLM ($p=0,889$). Následně jsme mezi sebou porovnali pacienty se všemi DG pomocí Kruskal-Wallisova testu na základě průměrného

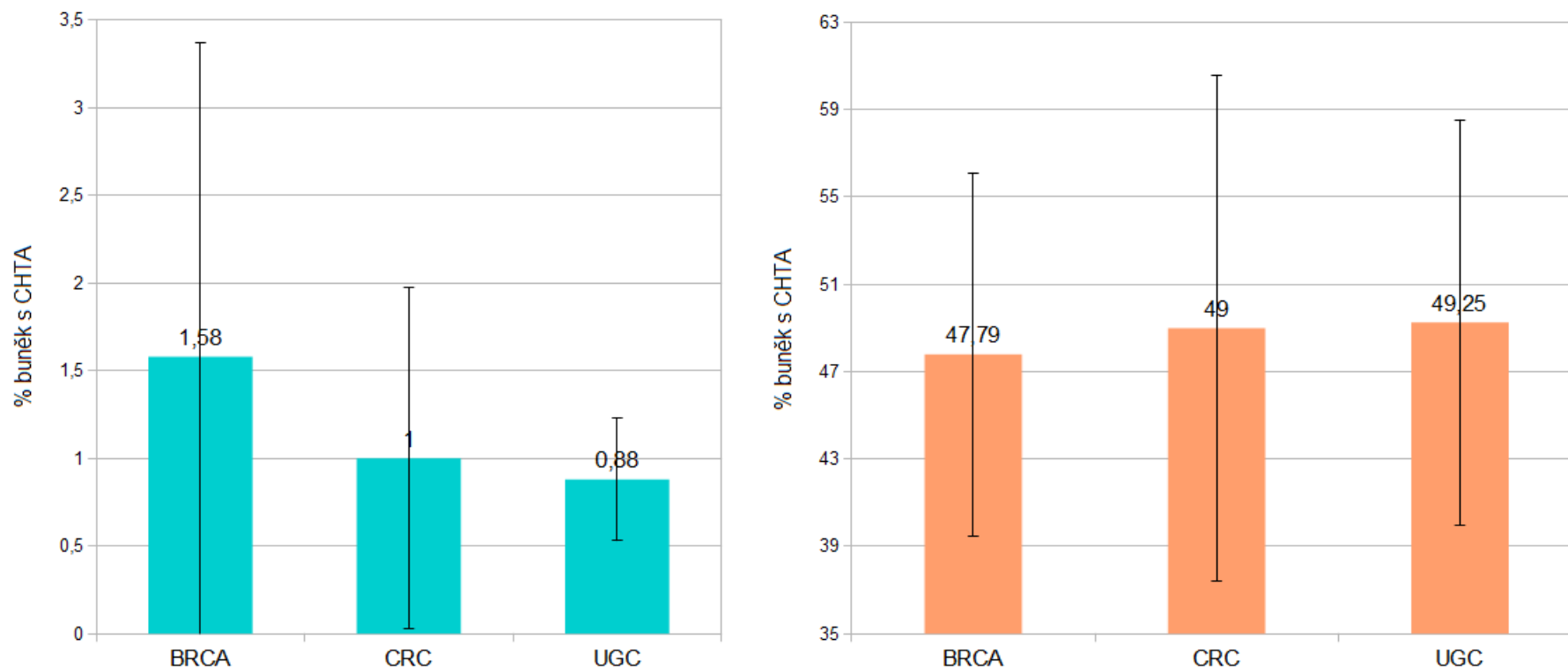
procenta aberantních buněk pouze s CHT zlomy. Pomocí χ^2 nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi jednotlivými DG bez působení BLM ($p=0,702$) ani po jeho přidání k PBL těchto osob ($p=0,256$). Průměrné procento buněk s CHT zlomy vystavených a nevystavených působení BLM u pacientů jednotlivých DG ukazuje (*Tab. 11, Graf 2 a 3*).

Aberantní buňky s CHT zlomy/ kouření a věk

Porovnání průměrného procenta aberantních buněk s CHT zlomy v souvislosti s kouřením a věkem jsme provedli výpočtem Pearsonova korelačního koeficientu. Do výpočtu byly zahrnuty skupiny PB a ZB. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi průměrným procentem buněk s CHT zlomy u PB a ZB v souvislosti s věkem ($p=0,588$), a ani v souvislosti s kouřením ($p=0,905$). Kouření ani věk tedy nemá dle našich zjištění na procento aberantních buněk se zlomy, indukovanými BLM významný efekt.

DG	- BLM			+ BLM		
BRCA (n=24)	1,58±1,79 (Me=1,0; 0-7)			47,79 ± 8,32 (Me=45,50; 35-63)		
nádory trávicí trubice a zažívacích orgánů (n=18)	1,00±0,97 (Me=1,0; 0-3)			49±11,59 (Me=48,0; 31-69)		
nádory urogenitálního systému (UGC) (n=8)	0,88±0,35 (Me=1,0; 0-1)			49,25±9,29 (Me=45,50; 36-63)		
p	0,7	0,42	0,62	0,91	0,26	0,71
						0,62
						0,89

Tab. 11: Průměrné procento aberantních buněk s CHT zlomy ve skupinách pacientů s různými DG. Hodnoty p jsou uvedeny u porovnání všech DG mezi sebou bez BLM a také po tomto působení. Dále jsou vždy porovnávány dvě vybrané DG mezi sebou.



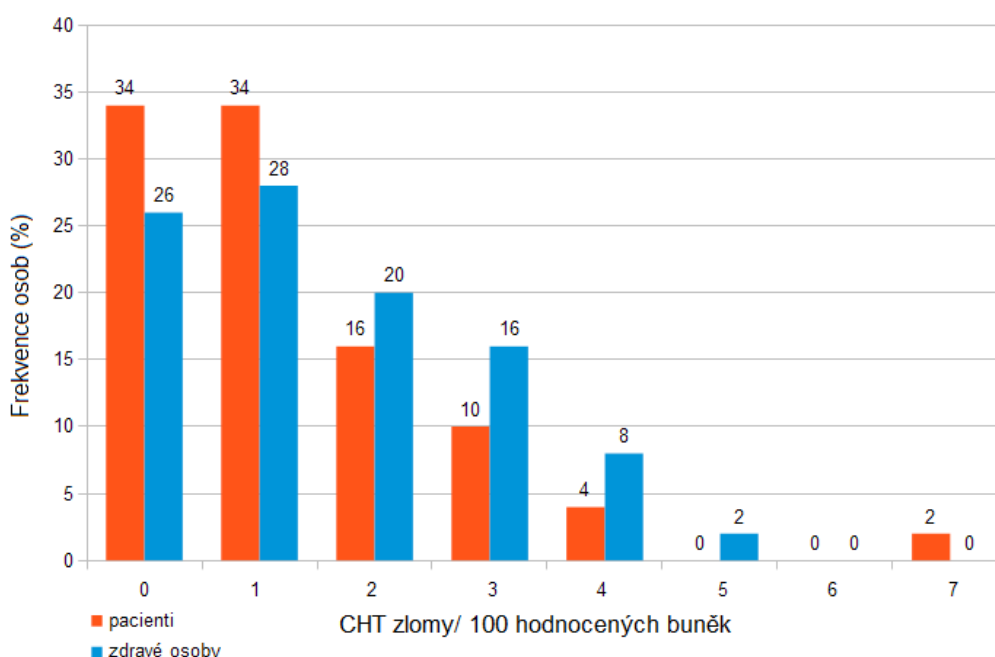
Graf 2 a 3: Průměrné procento buněk s CHT zlomy v závislosti na DG u pacientů; (graf vlevo: bez přidaného BLM, graf vpravo: po působení BLM).

6.1.3. Statistické porovnání hladiny zlomů v jednotlivých skupinách

Hladina CHT zlomů/b

Průměrná hladina CHT zlomů/b ve skupině Z0 byla $0,02 \pm 0,01$ (Me=0,1; 0-5) a ve skupině ZB $1,46 \pm 0,40$ (Me=1,48; 0,78-2,38). U skupiny pacientů byly tyto hodnoty nižší v obou případech, tj. u P0 $0,01 \pm 0,01$ (Me=0,1; 0-0,07) a u PB $1,39 \pm 0,41$ (Me=1,32; 0,72-2,56). Nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi hodnotou CHT zlomů/b u onkologických pacientů oproti zdravým osobám bez BLM ($p=0,166$) ani po expozici PBL BLM ($p=0,354$).

I přesto, že hodnoty v *Grafu 4* slouží pouze jako referenční, lze pozorovat zajímavou souvislost mezi reparační schopností v závislosti na skupině osob, kdy 34% pacientů vykazuje nulovou hodnotu CHT zlomů oproti 26% zdravých osob. Podobný trend procentuálního zastoupení obou skupin lze sledovat při přítomnosti jednoho CHT zlomu/ 100 hodnocených metafází. Naopak s narůstajícím množstvím CHT zlomů (od 2% výše) dochází k poklesu procentuálního zastoupení pacientů oproti zdravým osobám.



Graf 4: Distribuce P0 a Z0 podle hodnoty CHT zlomů/ 100 hodnocených buněk.

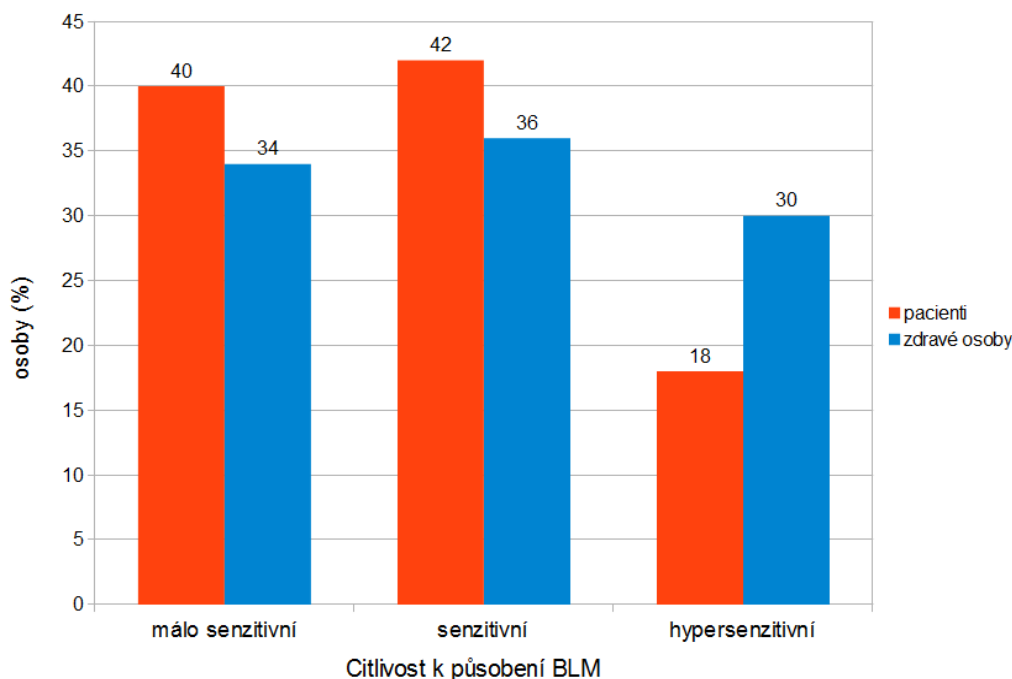
Interindividuální variabilita

Na základě průměrné hodnoty CHT zlomů/b po působení BLM jsme pacienty a zdravé osoby arbitrárně rozdělili na méně senzitivní, senzitivní a hypersenzitivní skupiny jedinců. Dostáváme tak přehled o „interindividuální variabilitě“ při odpovědi na mutagen. Pro výpočet hraničních hodnot

jednotlivých skupin byly použity tertily vypočítané z mediánu průměrných hodnot CHT zlomů/b u zdravých osob. Z výsledků je patrné, že 40% pacientů a 34% zdravých osob je k působení BLM málo senzitivní, 42% pacientů a 36% zdravých osob je senzitivní. Nejméně početnou skupinu tvořili hypersenzitivní jedinci, kterých bylo u pacientů 18% a u zdravých osob 30%. Nejcitlivějších jedinců k BLM je tak v případě skupiny zdravých osob o 54% více než u skupiny pacientů. Profil rozložení pacientů a zdravých osob do jednotlivých skupin jsme ověřili χ^2 testem, který neprokázal signifikantní rozdíl ($\chi^2=1,97$, $p=0,373$, Kruskal-Wallisův test).

Citlivost k působení BLM	Rozptyl průměrných hodnot CHT zlomů/b pro obě skupiny osob	Zastoupení jednotlivých skupin (%)	
		pacienti	zdravé osoby
málo senzitivní	< 1,21	40	34
senzitivní	1,22 – 1,63	42	36
hypersenzitivní	> 1,64	18	30
p		0,37	

Tab. 12: Procentuální zastoupení pacientů a zdravých osob dle citlivosti k působení BLM.



Graf 5: Procentuální zastoupení pacientů a zdravých osob dle citlivosti k působení BLM.

Hladina CHT zlomů/b vs. věk

Vliv věku studovaných osob na průměrné množství CHT zlomů/b jsme testovali pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Nepodařilo se nám však prokázat významný vztah mezi těmito veličinami. Nejprve jsme porovnali hladinu CHT zlomy/b v souvislosti s věkem bez expozice BLM (P0 a Z0; $p=0,225$) a po působení BLM (ZB a PB; $p=0,122$). Na hranici signifikance byla pouze korelace mezi věkem a průměrným množstvím CHT zlomů/b u Z0 ($p=0,078$), další stratifikace pak neprokázala vliv věku na množství CHT zlomů/b u ostatních studovaných skupin osob: P0 ($p=0,433$), PB ($p=0,364$) a ZB ($p=0,261$).

CHT zlomy/b vs. věk	p	Pearsonův korelační koeficient (hodnota p)
PB	0,36	0,12
ZB	0,26	
P0	0,43	0,23
Z0	0,078*	

Tab. 13: Výsledky porovnání hodnoty CHT zlomů/b s věkem pacientů a zdravých osob.

* hraniční hodnota statistické významnosti

Hladina CHT zlomů/b vs. kouření

Výsledky statistické analýzy neprokázaly souvislost mezi kouřením a množstvím CHT zlomů/b na základě Pearsonova korelačního koeficientu, kdy pro P0 a Z0 byla hodnota $p=0,515$ a pro PB a ZB $p=0,357$. Stejně porovnání jsme provedli pomocí Mann-Whitney U-testu. Nebyla tak prokázána signifikantní souvislost bez působení BLM (P0, Z0; $p=0,614$) ani po expozici PBL BLM (PB, ZB; $p=0,568$). Korelaci mezi kouřením a CHT zlomy/b jsme také určili pro jednotlivé skupiny osob Mann-Whitney U-testem. Pro Z0 byla hodnota $p=0,633$, po působení BLM (ZB) pak $p=0,923$. Oboustranná asymptotická signifikance pro korelaci mezi kouřením a množstvím CHT zlomů/b u P0 byla ($p=0,306$) a pro PB ($p=0,394$).

CHT zlomy/b vs. kouření	p	Pearsonův korelační koeficient (hodnota p)
PB	0,39	0,36
ZB	0,92	
P0	0,31	0,52
Z0	0,63	

Tab. 14: Výsledky porovnání hodnoty CHT zlomů/b s věkem pacientů a zdravých osob.

Hladina CHT zlomů/b vs. pohlaví a diagnóza

Statisticky významný rozdíl mezi průměrným množstvím CHT zlomů/b a pohlavím nebyl prokázán bez působení BLM (P0 a Z0; $p=0,693$) ani po expozici PBL BLM (PB a ZB; $p=0,968$). Na základě rozdělení pacientů do tří skupin podle DG (BRCA, CRC a UGC) jsme testovali souvislost mezi průměrným množstvím CHT zlomů/b a DG. Nebyl tak prokázán signifikantní rozdíl mezi jednotlivými DG a průměrným množstvím CHT zlomů/b bez BLM $\chi^2=2,9$, $p=0,408$ ani po působení BLM $\chi^2=1,29$, $p=0,732$.

Analýza rozptylu (CHT zlomy/b vs. pohlaví, věk, kouření, diagnóza)

Vliv základních charakteristik studovaných osob (pohlaví, věk, kouření a diagnóza) na množství CHT zlomů/b jsme testovali analýzou rozptylu (test ANOVA, Analysis of Variance), kdy jsme porovnali střední hodnoty pro všechny možné páry studovaných faktorů. Test ANOVA neprokázal signifikantní souvislost mezi průměrným množstvím CHT zlomů/b a následujícími faktory: pohlavím, věkem, kouřením a diagnózou u pacientů

Test ANOVA	Pacienti + zdravé osoby (hodnota p)	
BLM	-	+
pohlaví	0,79	0,93
věk	0,35	0,18
kouření	0,71	0,57
DG	0,11	0,81

Tab. 15: Analýza rozptylu (CHT zlomy/b vs. pohlaví, věk, kouření, diagnóza).

CHT zlomy/b vs achromatidové léze/b

Souvislost mezi průměrným počtem achromatidových lézí/b a průměrným počtem CHT zlomů/b jsme porovnali pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. V případě porovnání ZB a PB se podařilo prokázat velmi silnou signifikantní korelaci ($P < 0,01$) mezi průměrným množstvím CHT zlomů/b a průměrným množstvím achromatidových lézí/b. U stejných osob bez ovlivnění BLM (P0 vs. Z0) jsme tento vztah nepozorovali ($p=0,680$). Dále jsme pomocí tohoto testu porovnali stejné parametry pro jednotlivé skupiny Z0 ($p=0,917$), P0 ($p=0,739$), ZB ($p < 0,01$) a PB ($P < 0,01$). Dle našich výsledků tedy hladina CHT zlomů narůstá úměrně s hladinou achromatidových lézí po působení BLM.

CHT zlomy/b vs. gapy/b	p	Pearsonův korelační koeficient (hodnota p)
PB	< 0,01*	< 0,01*
ZB	< 0,01*	
P0	0,74	0,680
Z0	0,92	

Tab. 16: Výsledky porovnání hodnoty CHT zlomů/b s hodnotou achromatidových lézí/b.

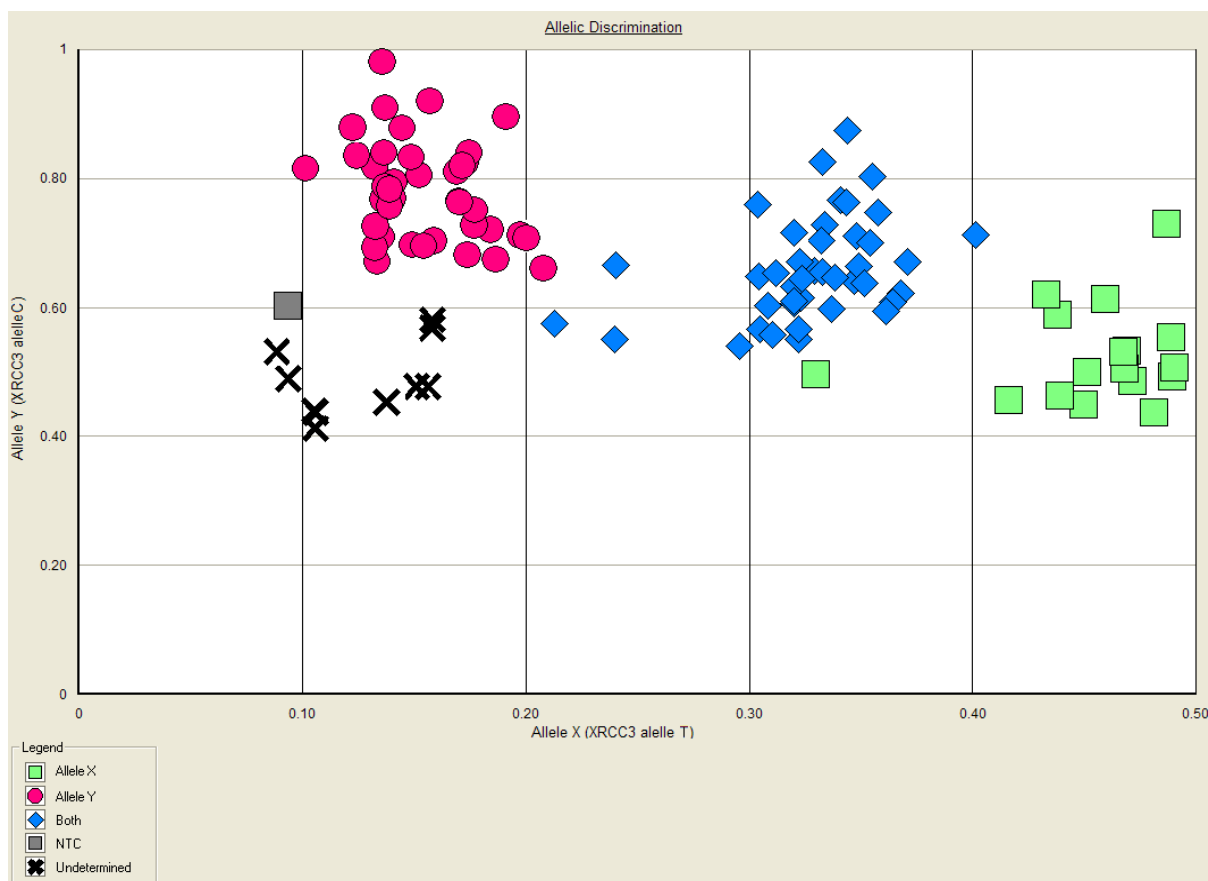
* velmi silná signifikantní korelace

6.2. Pilotní stanovení polymorfismů v genech opravy dvouvláknových zlomů DNA

Genotypizace byla provedena přinejmenším dvakrát, soulad mezi stanoveními byl 100%. Výsledky alelilcké diskriminace TaqMan u obou SNP (rs861539; XRCC3, rs1048771; RAD54L) jsou uvedeny v: *Graf 6* (XRCC3) a *11* (RAD54). Distribuce genotypů u zdravých osob je pro oba studované geny (XRCC3, RAD54L) v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou, kdy χ^2 pro XRCC3 je 0,16, $p=0,923$ a pro RAD54L 0,06, $p=0,927$. Frekvence variantní alely genu XRCC3 (rs861539) je vyšší u pacientů (0,40) než u zdravých osob (0,31). Rozdílné výsledky nebyly signifikantní, $\chi^2=0,96$, $p=0,526$. Frekvence variantní alely genu RAD54L (rs1048771) je u pacientů i zdravých osob shodná. Distribuce genotypů je ilustrována v: *Graf 7*.

XRCC3 (rs861539)

Porovnání průměrného množství CHT zlomů/b v souvislosti s variantní alelou (T) genu XRCC3 (rs861539) u pacientů a zdravých osob pomocí Pearsonova korelačního koeficientu neodhalilo významnou souvislost ve vzorcích nevystavených BLM ($p=0,745$) ani po expozici BLM ($p=0,310$). Porovnání průměrů množství CHT zlomů/b v souvislosti s variantní alelou (T) v genu XRCC3 (rs861539) jak bez ovlivnění, tak s ovlivnění BLM je uvedeno v: *Graf 8, 9*.



Graf 6: Alelická diskriminace genu XRCC3 (rs861539).

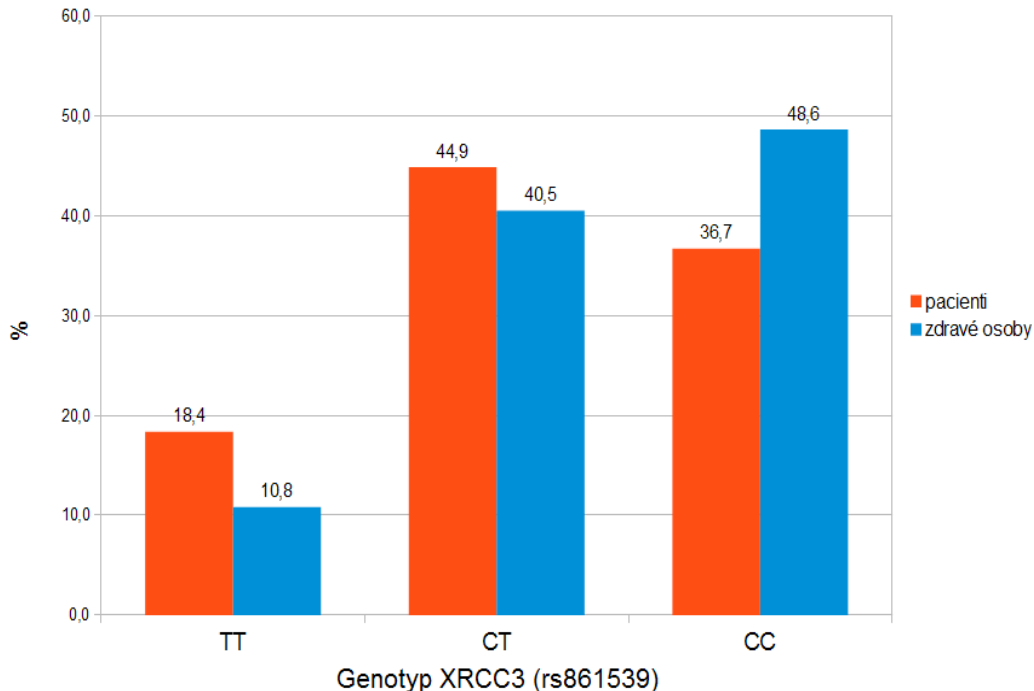
Naměřený překryv sporné variantní alely společně s heterozygotním stavem byl re-analizován s pozitivním výsledkem. Legenda pro Graf 6 a *Tab. 17* je shodná.

XRCC3													
Pacienti							Zdravé osoby						
NTC	719	742	753	766	776	791		K26	K36	K50	K59	K4	
698	721	743	758	768	777	794		K27	K38	K51	K60	K5	
699	725	744	760	770	778	792	K11	K28	K40	K52	K61	K6	
705	726	745	761	771	780		K13	K29	K42	K53	K62	K30	
706	727	748	762	772	783		K15	K31	K44	K54	K63	K64	
708	732	749	763	773	787		K22	K33	K46	K56	K65	K755	
710	733	750	764	774	789		K23	K34	K48	K57	K66	K757	
718	736	751	765	775	790		K25	K35	K49	K58	K2		

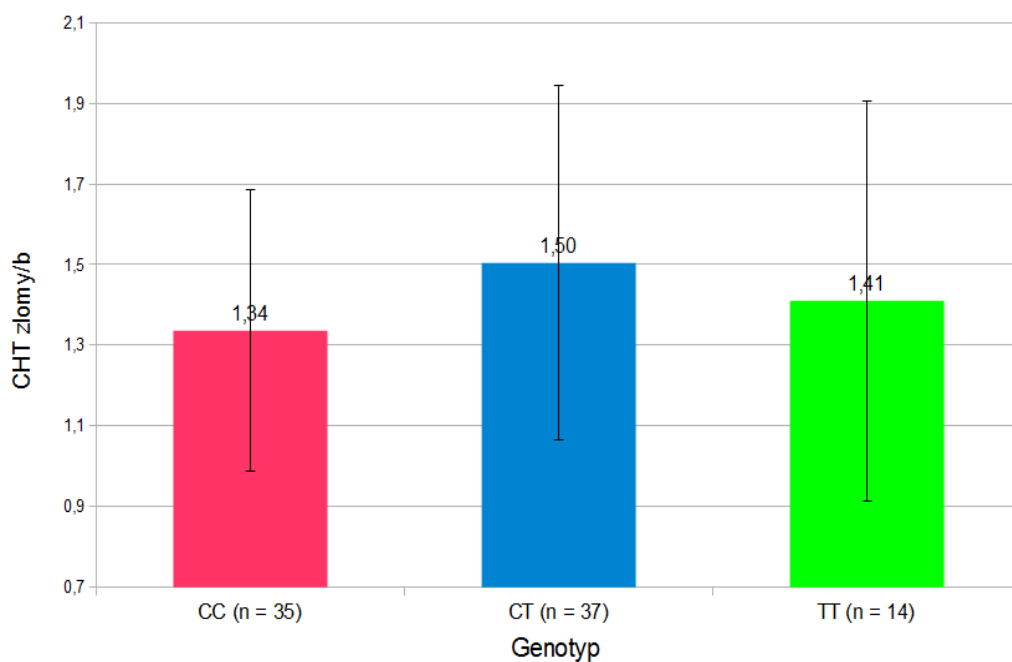
Legenda:

označení	genotyp
	TT
	CT
	CC

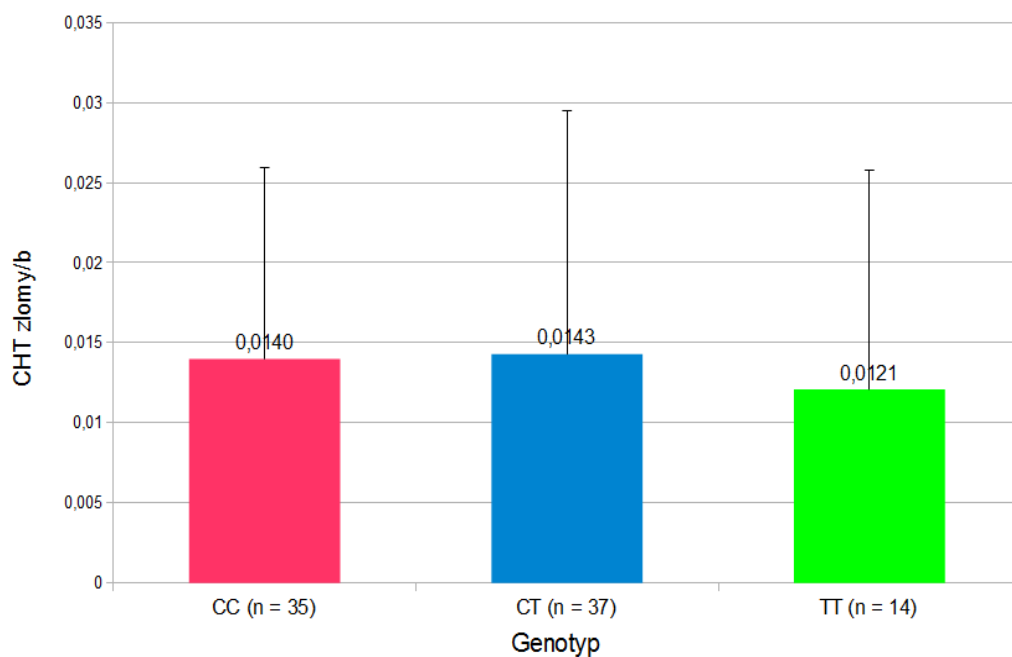
Tab. 17: Výsledky RT-PCR pro gen XRCC3 (rs861539). Červeně jsou vyznačeny vzorky, u kterých se nepodařila amplifikace DNA.



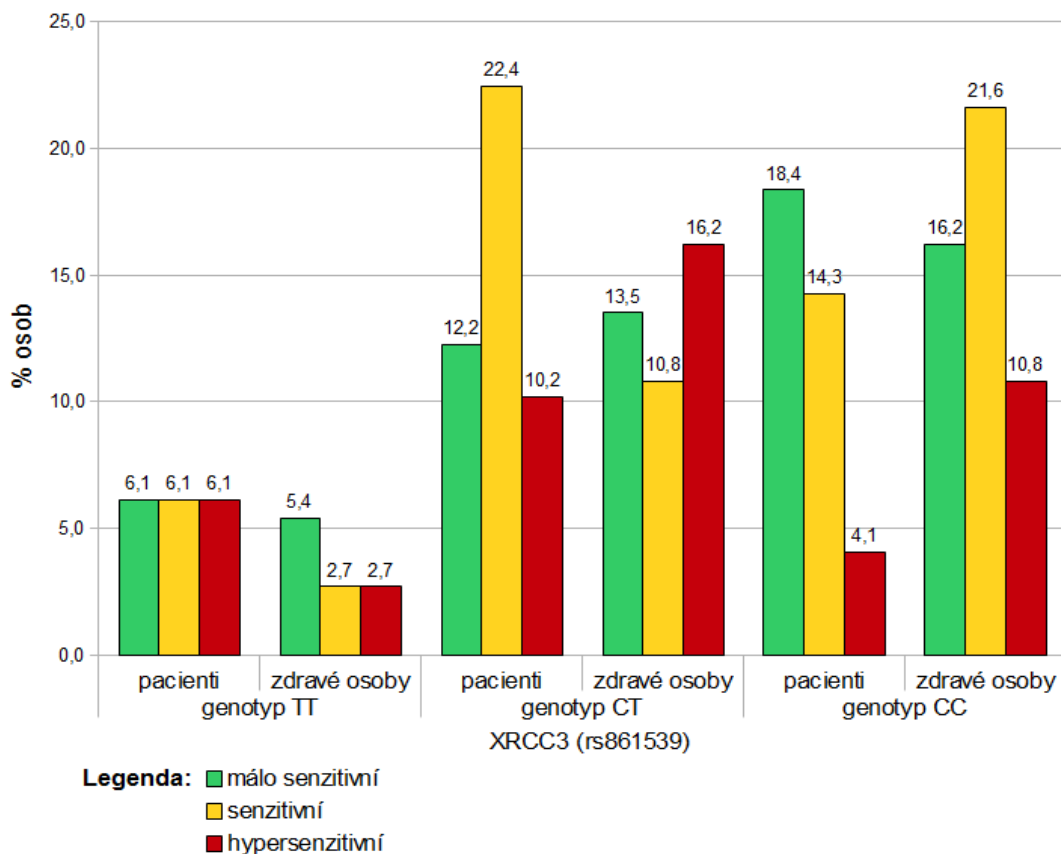
Graf 7: Procentuální zastoupení pacientů a zdravých osob podle výsledků alelické diskriminace genu XRCC3 (rs861539). Alela T je variantní.



Graf 8: Průměrné množství CHT zlomů/b indukovaných BLM u pacientů a zdravých osob v závislosti na genotypu XRCC3 (rs861539).



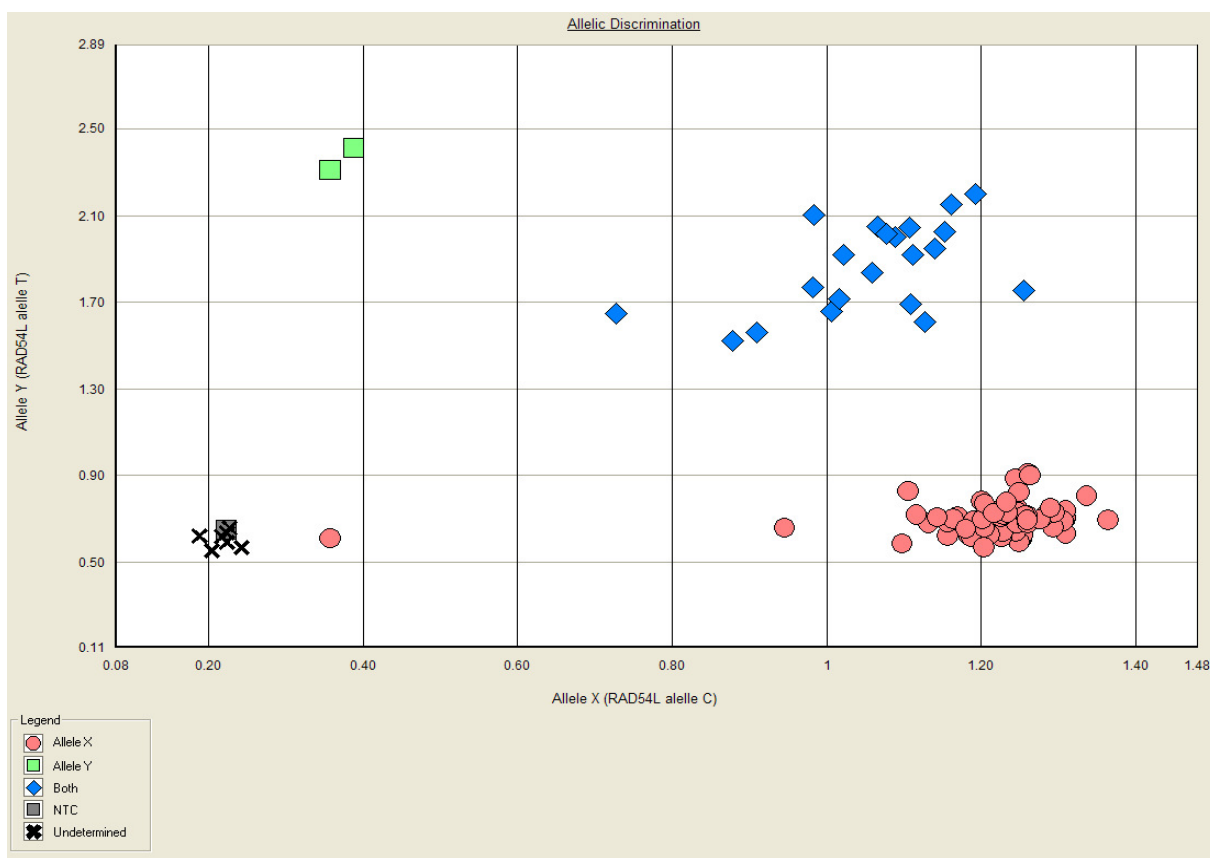
Graf 9: Průměrné množství CHT zlomů/b bez působení BLM u pacientů a zdravých osob v závislosti na genotypu XRCC3 (rs861539).



Graf 10: Procentuální zastoupení pacientů a zdravých osob na základě výsledků alelické diskriminace genu XRCC3 (rs861539) v souvislosti s citlivostí k působení BLM.

RAD54L (rs1048771)

Porovnání průměrného množství CHT zlomů/b v souvislosti s variantní alelou (T) genu RAD54L (rs1048771) u pacientů a zdravých osob pomocí Pearsonova korelačního koeficientu odhalilo významnou souvislost ve vzorcích nevystavených BLM ($p=0,030$), avšak tento vztah nebyl pozorován po expozici PBL BLM ($p=0,394$). Porovnání průměrného množství CHT zlomů/b v souvislosti s variantní alelou (T) v genu RAD54L (rs1048771) jak bez ovlivnění, tak s ovlivněním BLM je uvedeno v: *Graf 14, 15*.



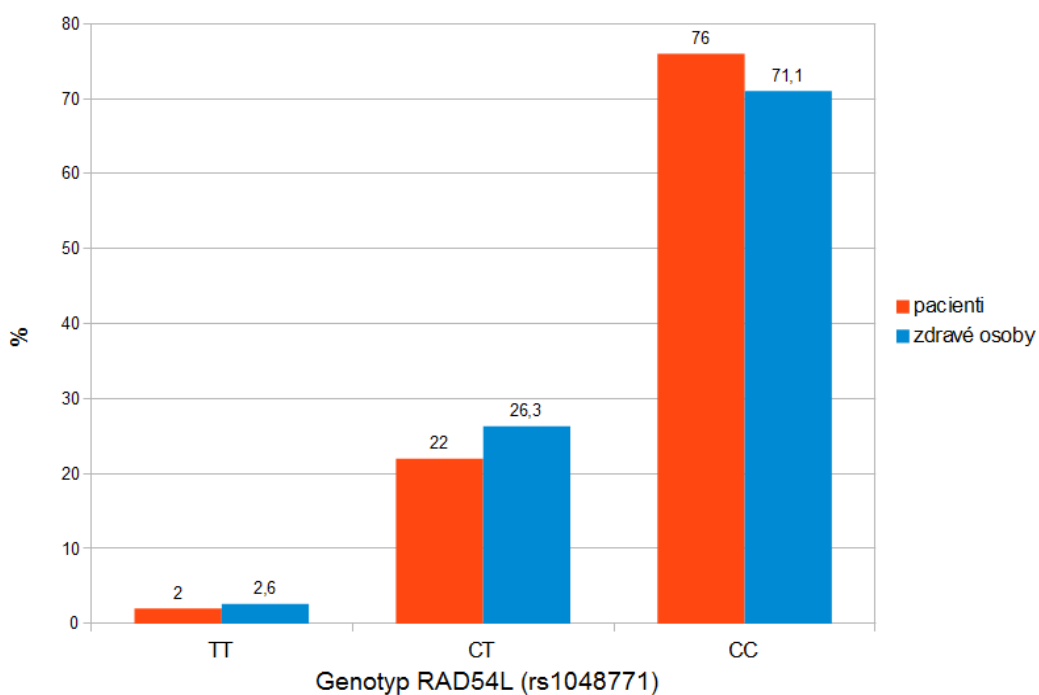
Graf 11: Alelická diskriminace genu RAD54L (rs1048771). Legenda pro Graf 11 a Tab. 18 je shodná.

RAD54L												
Pacienti							Zdravé osoby					
NTC	719	742	753	766	776	791		K26	K36	K50	K59	K4
698	721	743	758	768	777	794		K27	K38	K51	K60	K5
699	725	744	760	770	778	792	K11	K28	K40	K52	K61	K6
705	726	745	761	771	780		K13	K29	K42	K53	K62	K30
706	727	748	762	772	783		K15	K31	K44	K54	K63	K64
708	732	749	763	773	787		K22	K33	K46	K56	K65	K755
710	733	750	764	774	789		K23	K34	K48	K57	K66	K757
718	736	751	765	7	790		K25	K35	K49	K58	K2	

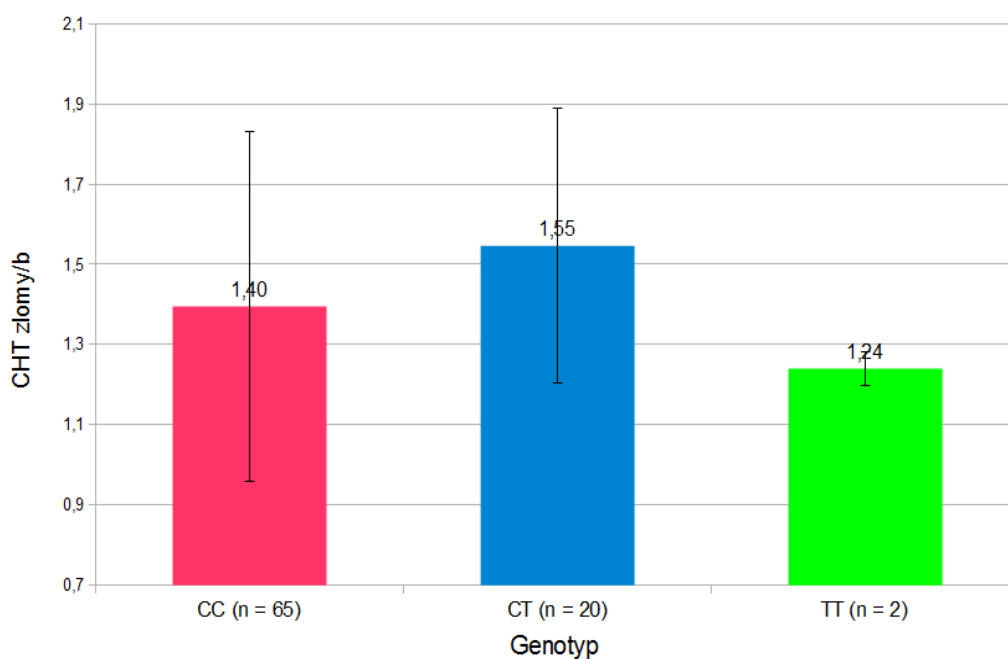
Legenda:

označení	genotyp
	TT
	CT
	CC

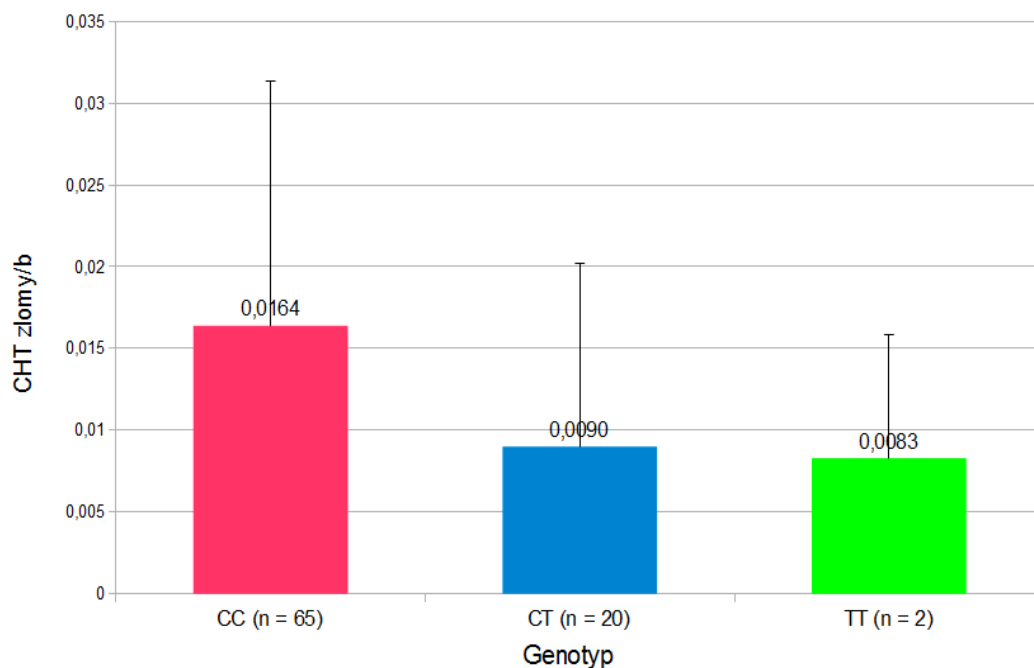
Tab. 18: Výsledky RT-PCR pro gen RAD54L (rs1048771).



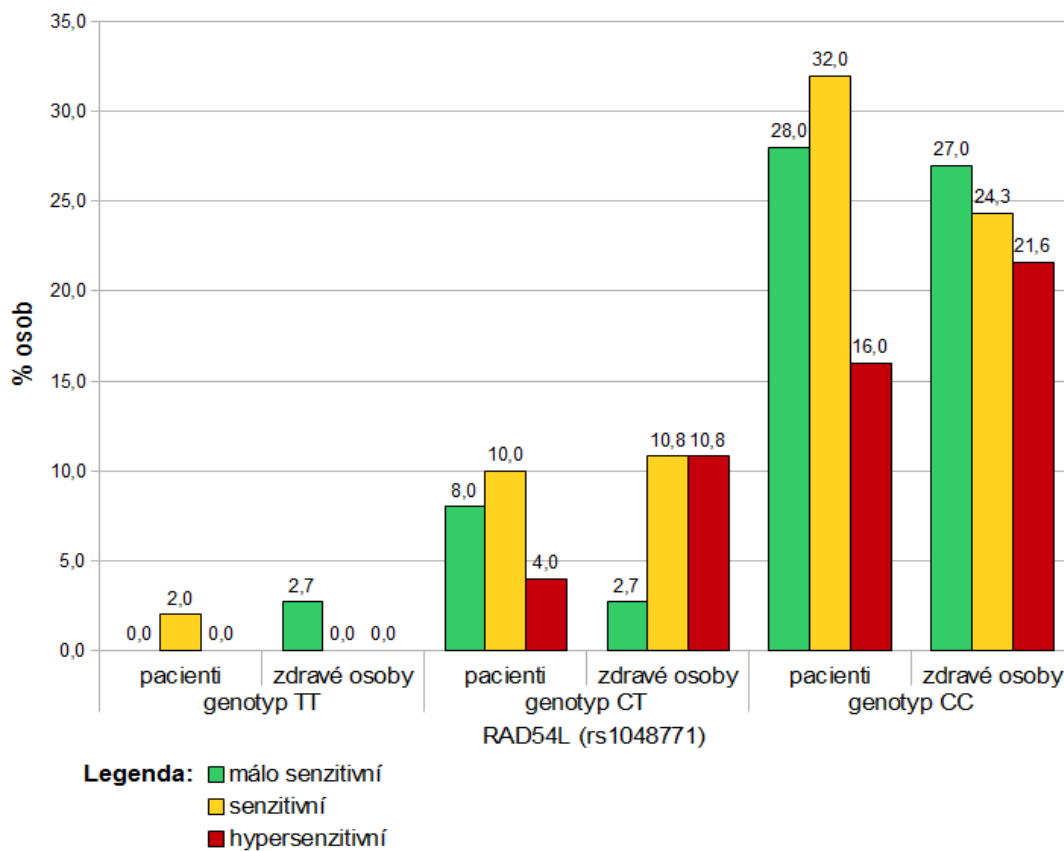
Graf 12: Procentuální zastoupení pacientů a zdravých osob podle výsledků alelické diskriminace genu RAD54L (rs1048771). Variantní alela T genu RAD54L (rs1048771) je zastoupena minoritně.



Graf 13: Průměrné množství CHT zlomů/b indukovaných BLM u pacientů a zdravých osob v závislosti na genotypu RAD54L (rs1048771).



Graf 14: Průměrné množství CHT zlomů/b bez přidaného BLM u pacientů a zdravých osob v závislosti na genotypu RAD54L (rs1048771).



Graf 15: Procentuální zastoupení pacientů a zdravých osob na základě výsledků alelické diskriminace genu RAD54L (rs1048771) v závislosti na citlivosti k působení BLM.

7. DISKUZE

Před třiceti lety došlo k vývoji tzv. „Challenge assay“ - tj. testu indukce aberací BLM, který byl spojován s kapacitou opravy DNA a s individuální vnímavostí k rozvoji malignit (Hsu, 1983). Hypotéza byla pravděpodobně zpočátku podpořena novými poznatky o autozomálně recesivních syndromech Xeroderma pigmentosum a Ataxia telangiectasia, které jsou spojovány s *in vivo* a *in vitro* zvýšenou radiosenzitivitou, ale i zvýšenou vnímavostí na jiné mutageny v důsledku poruchy reparační DNA (Taylor *et al.*, 1975, Parshad *et al.*, 1985). Tyto syndromy jsou spojeny s vysokým rizikem rozvoje nádorového onemocnění. Protože BLM má radiomimetické vlastnosti (Asakura *et al.*, 1975), lze předpokládat, že zvýšená citlivost k jeho působení predisponuje daného jedince k rozvoji nádorového bujení (Hsu *et al.*, 1989), což bylo potvrzeno v několika studiích (Spitz *et al.*, 1989, Cloos *et al.*, 1993, Zheng *et al.*, 2003). Challenge assay s použitím BLM je v současné době považována za nezávislý test pro posouzení individuálního rizika rozvoje nádorového onemocnění, založeného na určitých genetických predispozicích (Hsu *et al.*, 1989, Wu *et al.*, 1995, Yu *et al.*, 1999).

V naší práci jsme použili challenge assay pro účely měření reparační kapacity DNA u nádorových pacientů a zdravých osob. Do studie bylo zahrnuto padesát vzorků periferní krve od pacientů s nejčastějšími typy nově zjištěného nádorového onemocnění (DG BRCA, CRC a UGC, odběry krve byly uskutečněny ještě před započítáním léčby) a padesát vzorků od zdravých osob bez předchozího nádorového onemocnění. Chromozomální abnormality byly cytogeneticky hodnoceny ve vzorcích obou skupin po přidání BLM ke kultivovaným buňkám a zároveň ve vzorcích neovlivněných pro zjištění základní hladiny CHT. Jelikož nádory představují onemocnění na úrovni celého organismu, pacienti s nádorovým onemocněním by měli podle naší hypotézy vykazovat v PBL po působení BLM zvýšenou hladinu CHT zlomů ve srovnání se zdravými osobami. Toto zjištění by dokládalo zhoršenou reparační kapacitu DNA, která by mohla být dána vlivem tzv. genů malého účinku (Roberts *et al.*, 1999). Zároveň by zvýšená četnost CHT zlomů, indukovaných BLM ve vzorcích kultivovaných buněk zdravých osob, představovala biomarker zvýšeného rizika rozvoje nádorového onemocnění. Snížení NER v PBL pacientů s CRC bylo prokázáno ve studii Slysokve *et al.*, 2012a.

I přes prokazatelnou interindividuální odpověď pacientů a zdravých osob k působení BLM jsou naše výsledky v přímém rozporu s předchozím zjištěním jiných skupin (Hsu *et al.*, 1989, Cloos *et al.*, 1993, 1996, Spitz *et al.*, 1995, Zheng *et al.*, 2003, Hu *et al.*, 2013). Nepodařilo se nám prokázat signifikantní rozdíl mezi hladinou CHT zlomů/b po působení BLM u pacientů oproti zdravým osobám. Naše výsledky naopak ukazují zvýšenou, byť statisticky nevýznamnou, hladinu CHT zlomů/b u zdravých osob oproti pacientům. Zároveň nebyl prokázán významný rozdíl mezi průměrným procentem aberantních buněk s CHT zlomy mezi pacienty s nádorovým onemocněním a zdravými

osobami po působení BLM. Domníváme se proto, že vztah mezi rizikem vzniku nádoru a citlivostí k působení BLM není tak jednoznačný a nelze jej zobecnit na různé populace a odlišné typy nádorů.

Existuje celá řada faktorů, kterými mohou být námi popsána i publikovaná (Szekely *et al.*, 2003) kontroverzní zjištění vysvětlena. V první řadě jde o složení skupiny nádorových pacientů a zdravých osob. Szekely *et al.* (2003) ve své práci poukázal na důležitost výběru zdravých osob a na základě svých výsledků zpochybnil předchozí zjištění (Hsu *et al.*, 1989, Cloos *et al.*, 1993, 1996, Spitz *et al.*, 1995), týkající se challenge assay. Signifikantně zvýšenou hladinu CHT zlomů zaznamenal jak u pacientů s nádory hlavy a krku, tak u alkoholiků v porovnání se zdravými osobami. Jednalo se o vůbec první publikaci, kdy do souboru testovaných osob byli zahrnuti i zdraví lidé, jejichž expozice tabákovému kouři a vysoká konzumace alkoholu vedla k podobným zjištěním, jako u pacientů s tímto typem nádoru, a jejichž zařazením měly být odstraněny vlivy dalšího genotoxického působení na výsledek challenge assay. Protože se v práci této maďarské skupiny nepodařilo rozlišit mezi zdravými osobami s podobným životním stylem, a pacienty s nádory hlavy a krku, bleomycinový test dle tohoto autora může představovat pouze vhodnou metodu pro charakterizaci silné konzumace tabáku a alkoholu, avšak nikoli pro odhalení individuální citlivosti k nádorovému bujení (Szekely *et al.*, 2003). Toto zjištění by však na výsledky naší studie nemělo mít výraznější vliv, protože do námi studovaného souboru zdravých osob byli zařazeni pouze jedinci bez manifestní profesní genotoxické expozice a kuřáci byli zastoupeni v menší míře než u pacientů s nádorovým onemocněním. I když hladina získaných CHA představuje relevantní biomarker pro riziko rozvoje nádorů a jejich zvýšené množství bylo popsáno především u kuřáků (Hagmar *et al.*, 1994, 1998), v naší práci se tuto souvislost po působení BLM nepodařilo prokázat, patrně proto, že vysoká indukce zlomů BLM překryje relativně malé rozdíly v odpovědi kuřáků a nekuřáků, pokud tyto existují. Naše zjištění je v rozporu s nejnovější studií čínské skupiny, kdy byla pomocí challenge assay prokázána souvislost mezi rizikem rozvoje BRCA a pasivním kouřením (Hu *et al.*, 2013).

Námi studovaná skupina zdravých osob sice nemusela představovat průměr české populace, jednalo se ale o jedince bez předchozí léčby nádorového onemocnění, a tedy o stejnou koncepci studie jako u ostatních pokusů založených na challenge assay. Průměrný věk zdravých osob (68 let (Me=64; 16-91)) byl sice vyšší než u pacientů (60 let (Me=61,5; 34-85)), ale při statistickém porovnání věku s průměrnou hodnotou CHT zlomů/b ($p=0,12$) a průměrným procentem aberantních buněk s CHT zlomy ($p=0,588$) nebyla prokázána signifikantní souvislost. I když jsou procesy opravy poškození DNA závislé na věku (Hoeijmakers, 2009), v předchozích pracích nebyl prokázán vliv vyššího věku na míru získaných CHA (tedy měřených klasickou 48h cytogenetickou analýzou bez indukce aberací BLM, Hagmar *et al.*, 1998; Musak *et al.* 2013). Naopak po působení BLM byl v předchozích studiích pozorován velmi významný rozdíl mezi věkem a hodnotou CHT zlomů/b u zdravé populace, kdy průměrná hodnota CHT zlomů/b u osob starších 65 let byla 1,01 a u osob mladších 65 let byla 0,81 (Zheng *et al.*, 2003).

Mezi další rozdíly s možným vlivem na výslednou hladinu CHT zlomů patří zastoupení mužů a žen. Muži tvořili pouze 22% jedinců v naší skupině pacientů. Zbývá část (78%) byli především pacienti s DG BRCA (n=24), tedy téměř výhradně ženy (23 žen a 1 muž). Zastoupení mužů u skupiny zdravých osob bylo téměř dvojnásobné (42%) oproti pacientům. Pokud bychom předpokládali zvýšenou citlivost k působení BLM u jednoho z pohlaví, mohla by tato hypotéza ovlivnit naše zjištění. V této souvislosti se ale nepodařilo prokázat přímý vliv pohlaví na míru CHT zlomů indukovaných BLM. Naše zjištění je v souladu s výsledky studií dalších vědeckých skupin (Hsu *et al.*, 1989, Cloos *et al.*, 1993, 1996).

Pokud bychom uvažovali pouze složení skupiny pacientů u námi studovaného, relativně heterogenního souboru osob, může být vztah pozorovaných CHA k defektu reparační kapacity DNA různý pro různé skupiny diagnóz, stejně jako význam těchto změn pro prognózu pacientů a biologické chování malignit. Potenciální mutageny a karcinogeny a jejich metabolické produkty mohou aktivovat různé opravné dráhy, jejichž narušení může vyústit v nádorové bujení (Curtin, 2012). Pomocí bleomycinové challenge assay lze měřit pouze schopnost opravy DSB, které sice představují vysoké genotoxické riziko, ale k maligní transformaci dochází také při narušení opravných drah SSB nebo dalších lézí DNA. V jedné z prvních publikovaných prací s využitím challenge assay bylo však prokázáno, že pacienti s DG BRCA se svou citlivostí k BLM významně neliší od zdravých osob (Hsu *et al.*, 1989). Dle našich výsledků mají pacienti s DG BRCA průměrně 1,31 CHT zlomů/b po BLM oproti 1,46 CHT zlomů/b u zdravých osob, 1,44 u DG CRC a 1,41 u DG UGC. I když jsou rozdíly nevýznamné, je patrné, že pacienti s DG BRCA vykazují buď nejnižší citlivost k působení BLM nebo že zjištěná citlivost k působení BLM může hrát důležitou roli v karcinogenezi orgánů a tkání, které jsou denně v přímém kontaktu s vnějším prostředím (Hsu *et al.*, 1989). Počet námi studovaných pacientů není ale k analýze klinických proměnných dostatečný. Zamýšlíme proto ve studii pokračovat a zaměřit se na dvě vybrané skupiny nádorových pacientů (DG CRC a BCRA) a ověřit naše výsledky na větším souboru pacientů těchto dvou DG. Pokud by ovšem byla platná hypotéza, že pacienti s DG BRCA jsou méně senzitivní k BLM, může jejich četnost v našem souboru jedinců s nádorovým onemocněním hrát důležitou úlohu.

Námi naměřená nižší hladina CHT zlomů/b u pacientů oproti zdravým lidem po působení BLM může být také do jisté míry ovlivněna subjektivní chybou při hodnocení cytogenetických preparátů. Pokud je gap definován jako přerušování chromozómu, které však nenarušuje jeho integritu a zároveň není jeho velikost větší než průměr chromatidy (Revell, 1974, Savage, 2004), je možná záměna s CHT zlomem. Tato eventualita je tím pravděpodobnější, že po působení BLM jsme zjistili velmi signifikantní nárůst počtu gapů spolu s nárůstem CHT zlomů ($p < 0,01$). Snažili jsme se ale tuto subjektivní chybu minimalizovat tím, že každý vzorek byl hodnocen dvěma nezávislými hodnotiteli a sporné případy vždy diskutovány se zkušeným hodnotitelem. Proto lze tuto možnost ovlivnění konečného výsledku takřka vyloučit.

Nižší hodnota CHT zlomů/b a průměrné procento aberantních buněk s CHT zlomy byly pozorovány také v buňkách pacientů neovlivněných BLM. I když výsledky hodnocení těchto vzorků slouží pouze jako referenční hodnota aberantních buněk pro porovnání v pokusu s BLM, výsledky naznačují zajímavá zjištění. U nádorových pacientů může dojít k aktivaci opravných mechanismů v důsledku změn souvisejících se vznikem nádorového onemocnění, které mohou mít přímý vliv na snížené množství CHT zlomů. Challenge assay však neumožňuje posoudit míru získaných CHA (tedy aberací u vzorků bez použití BLM u pacientů a zdravých osob), která byla prokázána jako prediktivní marker rizika nádoru (Hagmar *et al.*, 1994, 1998, Natarajan, 2002, Norppa, 2006, Vodicka *et al.*, 2010). Metoda studia získaných CHA sice neposkytuje představu o příčině vzniku CHA (defekt reparace), ale lze tak zjistit důsledek, tj. míru poškození DNA. Právě z důvodu vysoké indukce apoptózy BLM je nutné v tomto testu použít 72h kultivaci PBL (Hsu *et al.*, 1989). Aby bylo možné zjistit přesnou hladinu získaných CHA, musela by být použita 48h kultivace, která se pro účely zjištění hladiny získaných aberací běžně užívá. Rozdíl mezi oběma metodami s různou dobou kultivace buněk spočívá v počtu buněčných cyklů stimulovaných PBL. V případě 72h kultivace, typicky používané při bleomycinové challenge assay, může totiž v průběhu druhého buněčného dělení dojít ke ztrátě (opravě) některých aberací a tudíž nepřesnému výsledku cytogenetického hodnocení spontánní hladiny aberací v buňkách. Vhodnou prospektivní analýzou pro odhalení rizika rozvoje nádoru by proto mohla být kombinace cytogenetického hodnocení získaných i BLM indukovaných CHA společně se značením DSB (tzv „gamma-H2AX assay“). Tuto kombinaci metod proto hodláme použít v budoucích studiích.

Nesourodé výsledky předchozích prací společně s naším zjištěním mohou být také dány rozdělením osob na základě citlivosti k působení BLM podle rozličných statistických parametrů (Hsu *et al.*, 1989, Szekely *et al.*, 2003). V této práci jsme k rozdělení na jednotlivé skupiny podle citlivosti k působení BLM použili tertily výpočtem z mediánu CHTA/b u zdravých osob. Do výpočtu nebyla zahrnuta skupina pacientů, protože představovala porovnávaný soubor osob. Dle našeho názoru je tento postup vhodnější než pevně daná hraniční hodnota jednoho CHT zlomu/b jako indikátoru citlivosti k BLM, protože interindividuální variabilita k BLM může být ovlivněna populačními faktory a environmentální expozicí. Arbitrární rozlišení testované skupiny podle citlivosti k BLM ale také není ideální. Při vhodně zvoleném výběru testovaných osob může být studovaný jedinec vzhledem k dalším testovaným osobám k působení BLM málo senzitivní, avšak při porovnání s jinými jedinci naopak hypersenzitivní. Míra průměrného množství CH zlomů je poměrně relativní hodnota a může být ovlivněna např. aktuálním zdravotním či hormonálním stavem. Je proto vhodné zahrnout do testování více osob s opakováním experimentu v průběhu určitého časového intervalu. Větší rozsah testované skupiny nebyl v rámci diplomové práce možný, protože challenge test a cytogenetické hodnocení je časově velmi náročná metoda. Méně přesným postupem je také rozlišení osob pouze na skupinu senzitivních a málo senzitivních k BLM podle mediánu počítaného z hodnoty CHT zlomů/b

u zdravých osob. Dle tohoto rozlišení je v naší skupině 42% pacientů senzitivních oproti 54% zdravým osobám. Naše hodnoty jsou nižší než naměřená data jiných skupin (Zheng *et al.*, 2003), kdy bylo zjištěno, že 67% pacientů a 51% zdravých osob je senzitivních k BLM. Tyto výsledky však mohou být ovlivněny tím, že Zheng *et al.* (2003) studoval pacienty s nádory plic. Možný vliv DG byl již diskutován. Sjednocení metodiky u dalších pokusů založených na challenge assay je důležitým předpokladem pro umožnění komparabilních studií (Sigurdson *et al.*, 2011).

Na další možný problém při posuzování radiosenzitivity poukázal ve své publikaci Vral *et al.* (2004), který popsal nevýznamný rozdíl mezi inter- a intra-individuální variabilitou v průběhu opakovaných experimentů. Jeho skupina měřila hladinu CHT zlomů v ozářených PBL zdravých jedinců v průběhu tří let. Při statistickém vyhodnocení opakovaných experimentů nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi inter- a intraindividuelní variabilitou, a autoři proto poukazují na důležitost opakovaných krevních odběrů a hodnocení pro dosažení spolehlivých výsledků (Vral *et al.*, 2004). U nádorových pacientů je ale možnost opakovaných odběrů prakticky vyloučena z důvodu rychlého nasazení protinádorové terapie, která by mohla zkreslit výsledek challenge assay.

Výsledky cytogenetické analýzy jsme doplnili o genotypizaci kandidátních genů opravy poškození DSB (XRCC3, rs861539; RAD54L, rs1048771). SNP postihují kódující i intronové oblasti genomu. Značná část těchto malých genetických změn vyústí v synonymní kodonovou substituci, což je případ námi studovaného SNP v RAD54L (rs861539). Nelze se ovšem domnívat, že dvě různé nukleotidové sekvence kódující stejnou aminokyselinovou sekvenci nebudou mít dopad na funkci a fenotyp výsledného proteinu. Kimchi-Sarfaty *et al.* (2007) prokázal, že synonymní kodonová substituce může mít vliv na sbalení proteinu a potažmo tak ovlivní jeho funkci. Je to dáno kinetikou překladu sekvence mRNA na ribosomech, kdy buňka na neobvyklý kodon reaguje pomalejší translací. Alterovaná kinetika translace tak může vyústit v zaujímavé jiné uspořádání prostorové struktury vznikajícího enzymu. I když je četnost publikací o RAD54L velmi nízká, úloha námi studovaného SNP (rs861539) v genu RAD54L byla již dříve popsána jako možný marker nádorů mozku, protože významně zvýšená frekvence tohoto polymorfismu byla zjištěna u pacientů s nádory meningeální tkáně oproti zdravým osobám (Leone *et al.*, 2003). Z našich výsledků lze sice usuzovat na možný protektivní účinek variantní alely RAD54L (rs861539) ve spojitosti s opravou poškození DNA, protože jsme prokázali významnou souvislost s nižší hladinou CHT zlomů ve vzorcích nevystavených BLM. Bohužel četnost variantní alely byla v naší studii velmi nízká. Zároveň data naměřená u vzorků bez působení BLM slouží jen jako kontrolní. Další měření jsou proto nezbytná. Také SNP (rs861539) v genu XRCC3 byl prokázán jako rizikový pro rozvoj nádorů močového měchýře (Matullo *et al.*, 2001) a melanomu (Winsey *et al.*, 2000). V této diplomové práci se však nepodařilo prokázat zvýšenou frekvenci variantní alely T v genu XRCC3 (rs861539) u pacientů oproti zdravým osobám. Dle našich výsledků zároveň tento SNP nesouvisí s vyšší hladinou CHT zlomů po působení BLM.

Podle výsledků předchozích studií lze sice usuzovat, že SNP modulují riziko rozvoje nádoru (Theodoratou *et al.*, 2012), prokazatelnou souvislost v tomto procesu má ale pravděpodobně jen jejich vzájemná kombinace jako celku (Tomlinson *et al.*, 2012).

8. ZÁVĚRY

Cílem diplomové práce bylo objasnit vztah mezi CHA v periferních lymfocytech onkologických pacientů, jejich reparační kapacitou DNA a polymorfismy genů účastnících se procesu opravy DNA. Získaná data byla korelována s DG nádorového onemocnění a porovnána se skupinou zdravých osob. Hlavním předmětem studie bylo ověření hypotézy, že zvýšená hladina chromozomálního poškození v PBL nově diagnostikovaných a v době odběru neléčených nádorových pacientů a zdravých osob souvisí se sníženou individuální schopností opravovat poškození DNA, a že tedy představuje prediktivní biomarker rizika nádorového onemocnění. Tuto hypotézu jsme ověřovali pomocí testu indukce aberací BLM (tzv. „Challenge assay“), v průběhu které jsme cytogeneticky hodnotili hladinu CHT zlomů u pacientů s nejčastějšími typy nádorů v ČR (BRCA, CRC a UGC) a u zdravých osob. Výsledky cytogenetické analýzy jsme poté doplnili o genotypizaci kandidátních genů (XRCC3, rs861539; RAD54L, rs1048771), zahrnutých při opravě poškození DNA, alelickou diskriminační analýzou TaqMan.

Nepodařilo se nám prokázat statisticky významně vyšší hladinu CHT zlomů a průměrného procenta buněk s CHT zlomy u pacientů oproti zdravým osobám po ovlivnění buněk BLM. Hladina CHT zlomů a také procento aberantních buněk s CHT zlomy po působení BLM nebyly významně ovlivněny kouřením, diagnózou pacientů, věkem a pohlavím u obou skupin - pacientů a kontrolních zdravých osob. Podařilo se nám prokázat interindividuální variabilitu v odpovědi na působení BLM jak u pacientů, tak i u zdravých osob. Statistické porovnání rozložení pacientů a zdravých osob do skupin na základě citlivosti k působení BLM však neprokázalo významný rozdíl. Na hladinu CHT zlomů po působení BLM neměla vliv variantní alela genu XRCC3 (241Met, rs861539; $p=0,310$) ani genu RAD54L (730A1a, rs1048771; $p=0,394$).

Na základě našich výsledků lze říci, že hladinu CHT zlomů indukovaných BLM nelze považovat za prediktivní biomarker rizika rozvoje nádorového bujení. Námi vybrané genové varianty kandidátních genů opravy poškození DNA dle našich výsledků neovlivňují míru chromozomálního poškození po působení BLM. Počet námi studovaných pacientů není ale k analýze klinických proměnných dostatečný. Proto jsou nezbytné další studie.

Seznam použité literatury

Adema AD, Cloos J, Verheijen RH, Braakhuis BJ, Bryant PE. Comparison of bleomycin and radiation in the G2 assay of chromatid breaks. *Int J Radiat Biol.* 2003 Aug;79(8):655-61.

Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res.* 2000 Aug;463(2):111-72.

Alexeev A, Mazin A, Kowalczykowski SC. Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nat Struct Biol.* 2003 Mar;10(3):182-6.

Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci.* 2007 Oct 1;120(Pt 19):3327-35. Review.

Au WW, Salama SA. Use of biomarkers to elucidate genetic susceptibility to cancer. *Environ Mol Mutagen.* 2005 Mar-Apr;45(2-3):222-8. Review.

Bender MA, Griggs HG, Bedford JS. Mechanisms of chromosomal aberration production. 3. Chemicals and ionizing radiation. *Mutat Res.* 1974 May;23(2):197-212.

Bishop DK, Ear U, Bhattacharyya A, Calderone C, Beckett M, Weichselbaum RR, Shinohara A. Xrcc3 is required for assembly of Rad51 complexes in vivo. *J Biol Chem.* 1998 Aug 21;273(34):21482-8.

Blanpain C, Mohrin M, Sotiropoulou PA, Passegué E. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell.* 2011 Jan 7;8(1):16-29.

Boffetta P, van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Puskailerova D, Znaor A, Kelecsenyi Z, Kurtinaitis J, Rachtan J, Forni A, Vermeulen R, Bonassi S. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol.* 2007 Jan 1;165(1):36-43.

Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Casalone R, Dalprà L, De Ferrari M, Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Migliore L, Padovani P, Pasquini R, Puntoni R, Sbrana I, Stella M, Bonassi S. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997 Apr;6(4):249-56. Review.

Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007 Mar;28(3):625-31.

Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dal Prà L, De Ferrari M, Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Padovani P, et al. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995 Feb;79(2):133-5.

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* 2012 Aug; 13(8) :790-801.

Buckton K.E. , H.J. Evans Eds. Methods for the analysis of human chromosome aberrations, WHO Geneva, World Health Organization, Geneva, 1973; 66 pp.

Chavez-Macgregor M, Clarke CA, Lichtensztajn D, Hortobagyi GN, Giordano SH. Male breast cancer according to tumor subtype and race : A population-based study. 2013 May 1;119(9):1611-7.

- Cloos J, Steen I, Joenje H, Ko JY, de Vries N, van der Sterre ML, Nauta JJ, Snow GB, Braakhuis BJ.** Association between bleomycin genotoxicity and non-constitutional risk factors for head and neck cancer. *Cancer Lett.* 1993 Nov 1;74(3):161-5.
- Cloos J, Spitz MR, Schantz SP, Hsu TC, Zhang ZF, Tobi H, Braakhuis BJ, Snow GB.** Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Apr 17;88(8):530-5.
- Cole KD, He HJ, Wang L.** Breast cancer biomarker measurements and standards. *Proteomics Clin Appl.* 2013 Jan;7(1-2):17-29.
- Chiolo I, Minoda A, Colmenares SU, Polyzos A, Costes SV, Karpen GH.** Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):732-44.
- Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B.** Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* 2003 Nov 15;193(1-2):3-34. Review.
- Crocker HR.** A Case of Dermatitis from Roentgen Rays. *Br Med J.* 1897 Jan 2; 1(1879): 8–9.
- Curtin NJ.** DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer.* 2012 Dec;12(12):801-17. Review
- Dronkert ML, HB Beverloo, RD Johnson, JH Hoeijmakers, M Jasin, R Kanaar.** Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol.* 2000 May; 20(9): 3147–3156.
- Dunlop MG, Dobbins SE, Farrington SM, Jones AM, Palles C, Whiffin N, Tenesa A, Spain S, Broderick P, Ooi LY, Domingo E, Smillie C, Henrion M, Frampton M, Martin L, Grimes G, Gorman M, Semple C, Ma YP, Barclay E, Prendergast J, Cazier JB, Olver B, Penegar S, Lubbe S, Chander I, Carvajal-Carmona LG, Ballereau S, Lloyd A, Vijayakrishnan J, Zgaga L, Rudan I, Theodoratou E; Colorectal Tumour Gene Identification (CORGI) Consortium, Starr JM, Deary I, Kirac I, Kovacević D, Aaltonen LA, Renkonen-Sinisalo L, Mecklin JP, Matsuda K, Nakamura Y, Okada Y, Gallinger S, Duggan DJ, Conti D, Newcomb P, Hopper J, Jenkins MA, Schumacher F, Casey G, Easton D, Shah M, Pharoah P, Lindblom A, Liu T; Swedish Low-Risk Colorectal Cancer Study Group, Smith CG, West H, Cheadle JP; COIN Collaborative Group, Midgley R, Kerr DJ, Campbell H, Tomlinson IP, Houlston RS.** Common variation near CDKN1A, POLD3 and SHROOM2 influences colorectal cancer risk. *Nat Genet.* 2012 May 27;44(7):770-6.
- Dušek L. et al.** Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat. Praha: FN v Motole, 2012.
- Essers J, Hendriks RW, Swagemakers SM, Troelstra C, de Wit J, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Kanaar R.** Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell.* 1997 Apr 18;89(2):195-204.
- Evans HJ, Scott D.** The induction of chromosome aberrations by nitrogen mustard and its dependence on DNA synthesis. *Proc. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.*, 1969 pp. 419–512
- Evans HJ., Savage JRK.** The relation between DNA synthesis and chromosome structure as revealed by X-ray damage. *J. Cell Biol.*, 1963. 18, pp. 525–540
- Falck J, Forment JV, Coates J, Mistrik M, Lukas J, Bartek J, Jackson SP.** CDK targeting of NBS1 promotes DNA-end resection, replication restart and homologous recombination. *EMBO Rep.* 2012 Jun;13(6):561-8.
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P.** Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* 2011 Jan;26(1):125-32.

Forget AL, Kowalczykowski SC. Single-molecule imaging brings Rad51 nucleoprotein filaments into focus. *Trends Cell Biol.* 2010 May;20(5):269-76. Review.

Frazier ML, Xi L, Zong J, Viscofsky N, Rashid A, Wu EF, Lynch PM, Amos CI, Issa JP. Association of the CpG island methylator phenotype with family history of cancer in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 2003 Aug 15;63(16):4805-8.

Giono LE, Manfredi JJ. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol.* 2006 Oct;209(1):13-20. Review.

Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell.* 1993 Jan 15;72(1):131-42.

Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell.* 1993 Jan 15;72(1):131-42.

Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, Lieber MR. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature.* 1997 Jul 31;388 (6641):492-5.

Grawunder U, Zimmer D, Kulesza P, Lieber MR. Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in vivo. *J Biol Chem.* 1998 Sep 18;273(38):24708-14.

Greenberg RA. Recognition of DNA double strand breaks by the BRCA1 tumor suppressor network. *Chromosoma.* 2008 Aug;117(4):305-17. Review.

Hagmar L, Brøgger A, Hansteen IL, Heim S, Högstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I, et al. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.* 1994 Jun 1;54(11):2919-22.

Hagmar L, Bonassi S, Strömberg U, Brøgger A, Knudsen LE, Norppa H, Reuterwall C. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res.* 1998 Sep 15;58(18):4117-21.

Hagmar L, Strömberg U, Bonassi S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lindholm C, Norppa H. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res.* 2004 Mar 15;64(6):2258-63.

Haince JF, Kozlov S, Dawson VL, Dawson TM, Hendzel MJ, Lavin MF, Poirier GG. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem.* 2007 Jun 1;282(22):16441-53.

Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. Review. *N Engl J Med.* 2009 Nov 5;361(19):1914.

Houldsworth J, Chaganti RS. Comparative genomic hybridization: an overview. *Am J Pathol.* 1994 Dec;145(6):1253-60. Review.

Howell WH. The life-history of the formed elements of the blood, especially the red blood corpuscles. *J Morphol* 1890;4:57-116.

Hsu TC. Genetic instability in the human population: a working hypothesis. *Hereditas.* 1983;98(1):1-9.

Hsu TC, Cherry LM, Samaan NA. Differential mutagen susceptibility in cultured lymphocytes of normal individuals and cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 1985 Aug;17(4):307-13.

- Hsu TC, Johnston DA, Cherry LM, Ramkissoon D, Schantz SP, Jessup JM, Winn RJ, Shirley L, Furlong C.** Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int J Cancer*. 1989 Mar 15;43(3):403-9.
- Huhn S, Pardini B, Naccarati A, Vodicka P, Hemminki K, Försti A.** Ancestral susceptibility to colorectal cancer. *Mutagenesis*. 2012 Mar;27(2):197-204.
- Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M.** The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer*. 2009 Jul 1;125(1):171-80.
- Izumi S, Fujiwara T, Ikeda M, Nishimura Y, Sugiyama K, Kawatsu K.** Novel gelatin particle agglutination test for serodiagnosis of leprosy in the field. *J Clin Microbiol*. 1990 Mar;28(3):525-9.
- Jackson SP, Bartek J.** The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009 Oct 22;461(7267):1071-8. Review.
- Jones PA, Baylin SB.** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002 Jun;3(6):415-28. Review.
- Joshi AD, Corral R, Siegmund KD, Haile RW, Marchand1 LL, Martínez ME, Ahnen DJ, Sandler R, Lance P, Stern MC.** Red meat and poultry intake, polymorphisms in the nucleotide excision repair and mismatch repair pathways and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009 March; 30(3): 472–479.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM.** A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007 Jan 26;315(5811):525-8.
- Klapstein K, Chou T, Bruinsma R.** Physics of RecA-mediated homologous recognition. *Biophys J*. 2004 Sep;87(3):1466-77.
- Knudsen LE, Hansen AM.** Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. *Int J Hyg Environ Health*. 2007 May;210(3-4):461-70.
- Knudson AG Jr.** Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820-3.
- Konecny M, Geryk E, Kubicek P, Stampach R, Kozel J, Stachon Z, Michalek J, Odehnal J, Dite P, Koska P, Kraus R, Holub J.** 2008. Prevalence Nádorů v České Republice 1989-2005-2015. Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity Brno 1-70.
- Laczmanska I, Gil J, Karpinski P, Stembalska A, Trusewicz A, Pesz K, Ramsey D, Schlade-Bartusiak K, Blin N, Sasiadek MM.** Polymorphism in nucleotide excision repair gene XPC correlates with bleomycin-induced chromosomal aberrations. *Environ Mol Mutagen*. 2007 Oct;48(8):666-71
- Lea, DE.** Actions of Radiations on Living Cells, *Cambridge University Press*. 1946 pp. xii+402 pp.
- Lee JH, Paull TT.** ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*. 2005 Apr 22;308(5721):551-4.
- Lees-Miller SP, Sakaguchi K, Ullrich SJ, Appella E, Anderson CW.** Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol Cell Biol*. 1992 Nov;12(11):5041-9.
- Leone PE, Mendiola M, Alonso J, Paz-y-Miño C, Pestaña A.** Implications of a RAD54L polymorphism (2290C/T) in human meningiomas as a risk factor and/or a genetic marker. *BMC Cancer*. 2003 Mar 4;3:6.
- Lichter P, Boyle AL, Cremer T, Ward DC.** Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic in situ hybridization. *Genet Anal Tech Appl*. 1991 Feb;8(1):24-35. Review

- Ma Y, Pannicke U, Lu H, Niewolik D, Schwarz K, Lieber MR.** The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis. *J Biol Chem.* 2005 Oct 7;280(40):33839-46.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR.** Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell.* 2002 Mar 22;108(6):781-94.
- Mailand N, Bekker-Jensen S, Fastrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, Lukas J.** RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):887-900.
- Matullo G, Guarrera S, Carturan S, Peluso M, Malaveille C, Davico L, Piazza A, Vineis P.** DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer.* 2001 May 15;92(4):562-7.
- Metzger L, Iiakis G.** Kinetics of DNA double-strand break repair throughout the cell cycle as assayed by pulsed field gel electrophoresis in CHO cells. *Int J Radiat Biol.* 1991 Jun;59(6):1325-39.
- Mole RH.** Ionizing radiation as a carcinogen: practical questions and academic pursuits The Silvanus Thompson Memorial Lecture delivered at The British Institute of Radiology on April 18, 1974. *Br J Radiol.* 1975 Mar;48(567):157-69.
- Musak L, Smerhovsky Z, Halasova E, Osina O, Letkova L, Vodickova L, Polakova V, Buchancova J, Hemminki K, Vodicka P.** Chromosomal damage among medical staff occupationally exposed to volatile anesthetics, antineoplastic drugs, and formaldehyde. *Scand J Work Environ Health.* 2013 Mar 22.
- Müller HM, Widschwendter A, Fiegl H, Ivarsson L, Goebel G, Perkmann E, Marth C, Widschwendter M.** DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res.* 2003 Nov 15;63(22):7641-5.
- Naccarati A, Pardini B, Hemminki K, Vodicka P.** Sporadic colorectal cancer and individual susceptibility: a review of the association studies investigating the role of DNA repair genetic polymorphisms. *Mutat Res.* 2007 May-Jun;635(2-3):118-45.
- Naccarati A, Pardini B, Stefano L, Landi D, Slyskova J, Novotny J, Levy M, Polakova V, Lipska L, Vodicka P.** Polymorphisms in miRNA-binding sites of nucleotide excision repair genes and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis.* 2012 Jul;33(7):1346-51. (a)
- Naccarati A, Polakova V, Pardini B, Vodickova L, Hemminki K, Kumar R, Vodicka P.** Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis.* 2012 Mar;27(2):211-8. (b)
- Natarajan AT, Berni A, Marimuthu KM, Palitti F.** The type and yield of ionising radiation induced chromosomal aberrations depend on the efficiency of different DSB repair pathways in mammalian cells. *Mutat Res.* 2008 Jul 3;642(1-2):80-5.
- Natarajan AT.** Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat Res.* 2002 Jul 25;504(1-2):3-16. Review.
- Neal JA, Dang V, Douglas P, Wold MS, Lees-Miller SP, Meek K.** Inhibition of homologous recombination by DNA-dependent protein kinase requires kinase activity, is titratable, and is modulated by autophosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2011 Apr;31(8):1719-33.
- Nimonkar AV, Genschel J, Kinoshita E, Polaczek P, Campbell JL, Wyman C, Modrich P, Kowalczykowski SC.** BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* 2011 Feb 15;25(4):350-62.

Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rössner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabiánová E, Srám RJ, Knudsen LE, Barale R, Fucic A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res.* 2006 Aug 30;600(1-2):37-45.

Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martínez-López W, Folle GA, Drets ME. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res.* 2002 Jul 25;504(1-2):17-36. Review.

Ogawa T, Yu X, Shinohara A, Egelman EH. Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science.* 1993 Mar 26;259(5103):1896-9.

Palles C, Cazier JB, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, Broderick P, Kemp Z, Spain SL, Almeida EG, Salguero I, Sherborne A, Chubb D, Carvajal-Carmona LG, Ma Y, Kaur K, Dobbins S, Barclay E, Gorman M, Martin L, Kovac MB, Humphray S; CORGI Consortium; WGS500 Consortium, Lucassen A, Holmes CC, Bentley D, Donnelly P, Taylor J, Petridis C, Roylance R, Sawyer EJ, Kerr DJ, Clark S, Grimes J, Kearsley SE, Thomas HJ, McVean G, Houlston RS, Tomlinson I. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet.* 2013 Feb;45(2):136-44.

Paull TT, Cortez D, Bowers B, Elledge SJ, Gellert M. Direct DNA binding by Brcal *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 May 22; 98(11): 6086–6091.

Pavlik T, Dusek L, Majek O, Babjuk M. Monitoring výsledků a kvality péče o pacienty s nádory urogenitálního systému v ČR; Institut biostatistiky a analýz, MU ČR. 2011

Parshad R, Sanford KK, Jones GM. Chromosomal radiosensitivity during the G2 cell-cycle period of skin fibroblasts from individuals with familial cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Aug;82(16):5400-3.

Peters U, Jiao S, Schumacher FR, Hutter CM, Aragaki AK, Baron JA, Berndt SI, Bézieau S, Brenner H, Butterbach K, Caan BJ, Campbell PT, Carlson CS, Casey G, Chan AT, Chang-Claude J, Chanock SJ, Chen LS, Coetzee GA, Coetzee SG, Conti DV, Curtis KR, Duggan D, Edwards T, Fuchs CS, Gallinger S, Giovannucci EL, Gogarten SM, Gruber SB, Haile RW, Harrison TA, Hayes RB, Henderson BE, Hoffmeister M, Hopper JL, Hudson TJ, Hunter DJ, Jackson RD, Jee SH, Jenkins MA, Jia WH, Kolonel LN, Kooperberg C, Küry S, Lacroix AZ, Laurie CC, Laurie CA, Le Marchand L, Lemire M, Levine D, Lindor NM, Liu Y, Ma J, Makar KW, Matsuo K, Newcomb PA, Potter JD, Prentice RL, Qu C, Rohan T, Rosse SA, Schoen RE, Seminara D, Shrubsole M, Shu XO, Slattery ML, Taverna D, Thibodeau SN, Ulrich CM, White E, Xiang Y, Zanke BW, Zeng YX, Zhang B, Zheng W, Hsu L; Colon Cancer Family Registry and the Genetics and Epidemiology of Colorectal Cancer Consortium. Identification of Genetic Susceptibility Loci for Colorectal Tumors in a Genome-Wide Meta-analysis. *Gastroenterology.* 2012 Dec 22.

Pfeiffer P, Goedecke W, Kuhfittig-Kulle S, Obe G. Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res.* 2004;104(1-4):7-13. Review.

Pierotti MA, Schichman SA, Sozzi G, et al. Oncogenes. In: Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine.* 5th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2000. Chapter 4.

Quennet V, Beucher A, Barton O, Takeda S, Löbrich M. CtIP and MRN promote non-homologous end-joining of etoposide-induced DNA double-strand breaks in G1. *Nucleic Acids Res.* 2011 Mar;39(6):2144-52.

Revell SH. The accurate estimation of chromatid breakage, and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1959 Sep 1;150:563-89.

Revell SH. The Breakage-and-Reunion Theory and the exchange Theory for chromosomal aberrations induced by ionizing radiations: a short history: *advanc radiat biol.* 1974. 4:367-416

Roberts SA, Spreadborough AR, Bulman B, Barber JB, Evans DG, Scott D. Heritability of cellular radiosensitivity: a marker of low-penetrance predisposition genes in breast cancer? *Am J Hum Genet.* 1999 Sep;65(3):784-94.

- Rolli, V., Ruf, A., Augustin, A., Schulz, G.E., Ménissier-de Murcia, J., and de Murcia, G.** "Poly(ADP-ribose) polymerase: Structure and function. *Oxford University Press*. 2000; 35-79.
- Romney CA, Paulauskis JD, Nagasawa H, Little JB.** Multiple manifestations of X-ray-induced genomic instability in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mol Carcinog*. 2001 Nov;32(3):118-27.
- Rossner P, Boffetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovsky Z, Landa K, Juzova D, Srám RJ.** Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ Health Perspect*. 2005 May;113(5):517-20.
- Salama SA, Serrana M, Au WW.** Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. *Mutat Res*. 1999 Jan;436(1):99-112. Review.
- Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, Esteller M.** Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*. 2011 Jun;6(6):692-702.
- Sartori A.A., C. Lukas, J. Coates, M. Mistrik, S. Fu, J. Bartek et al.** Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*. 2007 November 22; 450(7169): 509–514.
- Sasaki MS, Takata M, Sonoda E, Tachibana A, Takeda S.** Recombination repair pathway in the maintenance of chromosomal integrity against DNA interstrand crosslinks. *Cytogenet Genome Res*. 2004;104(1-4):28-34.
- Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M.** Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res*. 2003 Jul 1;63(13):3735-42.
- Savage JR.** On the nature of visible chromosomal gaps and breaks. *Cytogenet Genome Res*. 2004;104(1-4):46-55. Review
- Sax K.** An analysis of X-ray induced chromosome aberrations in *Tradescantia*. *Genetics*, 1940. 25 , pp. 41–68.
- Sax K.** Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by X-rays, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1941. 9, 93-103.
- Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H.** Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res*. 1998 Feb 15;58(4):604-8.
- Shen Z.** Genomic instability and cancer: an introduction. *J Mol Cell Biol*. 2011 Feb;3(1):1-3.
- Sigurdson AJ, Jones IM, Wei Q, Wu X, Spitz MR, Stram DA, Gross MD, Huang WY, Wang LE, Gu Thomas CB, Reding DJ, Hayes RB, Caporaso NE.** Prospective analysis of DNA damage and repair markers of lung cancer risk from the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial *Carcinogenesis*.; 2011. 32(1):69-73.
- Skjelbred CF, Svendsen M, Haugan V, Eek AK, Clausen KO, Svendsen MV, Hansteen IL.** Influence of DNA repair gene polymorphisms of hOGG1, XRCC1, XRCC3, ERCC2 and the folate metabolism gene MTHFR on chromosomal aberration frequencies. *Mutat Res*. 2006 Dec 1;602(1-2):151-62.
- Slyskova J, Naccarati A, Pardini B, Polakova V, Vodickova L, Smerhovsky Z, Levy M, Lipska L, Liska V, Vodicka P.** Differences in nucleotide excision repair capacity between newly diagnosed colorectal cancer patients and healthy controls. *Mutagenesis*. 2012 Jul;27(4):519-22. (a)
- Slyskova J, Korenkova V, Collins AR, Prochazka P, Vodickova L, Svec J, Lipska L, Levy M, Schneiderova M, Liska V, Holubec L, Kumar R, Soucek P, Naccarati A, Vodicka P.** Functional, genetic, and epigenetic aspects of base and nucleotide excision repair in colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2012 Nov 1;18(21):5878-87. (b)

Spain SL, Carvajal-Carmona LG, Howarth KM, Jones AM, Su Z, Cazier JB, Williams J, Aaltonen LA, Pharoah P, Kerr DJ, Cheadle J, Li L, Casey G, Vodicka P, Sieber O, Lipton L, Gibbs P, Martin NG, Montgomery GW, Young J, Baird PN, Morreau H, van Wezel T, Ruiz-Ponte C, Fernandez-Rozadilla C, Carracedo A, Castells A, Castellvi-Bel S, Dunlop M, Houlston RS, Tomlinson IP. Refinement of the associations between risk of colorectal cancer and polymorphisms on chromosomes 1q41 and 12q13.13. *Hum Mol Genet.* 2012 Feb 15;21(4):934-46.

Spitz MR, Fueger JJ, Beddingfield NA, Annegers JF, Hsu TC, Newell GR, Schantz SP. Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis, an independent risk factor for upper aerodigestive tract cancers. *Cancer Res.* 1989 Aug 15;49(16):4626-8.

Spitz MR, Hsu TC, Wu X, Fueger JJ, Amos CI, Roth JA. Mutagen sensitivity as a biological marker of lung cancer risk in African Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995 Mar;4(2):99-103.

Stewart GS, Panier S, Townsend K, Al-Hakim AK, Kolas NK, Miller ES, Nakada S, Ylanko J, Olivarius S, Mendez M, Oldreive C, Wildenhain J, Tagliaferro A, Pelletier L, Taubenheim N, Durandy A, Byrd PJ, Stankovic T, Taylor AM, Durocher D. The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell.* 2009 Feb 6;136(3):420-34.

Sugiyama T, Zaitseva EM, Kowalczykowski SC. A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J Biol Chem.* 1997 Mar 21;272(12):7940-5.

Székely G, Remenár E, Kásler M, Gundy S. Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? *Mutagenesis.* 2003 Jan;18(1):59-63.

Székely G, Remenár E, Kásler M, Gundy S. Mutagen sensitivity of patients with cancer at different sites of the head and neck. *Mutagenesis.*; 2005. 20(5):381-5.

Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell.* 1983 May;33(1):25-35. Review.

Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.*, 1998. pp. 5497–5508.

Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, Fukushima T, Sonoda E, Schild D, Thompson LH, Takeda S. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol.* 2001 Apr;21(8):2858-66.

Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog.* 2009;8:5.

Talseth-Palmer BA, Wijnen JT, Grice DM, Scott RJ. Genetic modifiers of cancer risk in Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 2013 Mar 8.

Taylor AC. Titration of heparinase for removal of the PCR-inhibitory effect of heparin in DNA samples. *Molecular Ecology.* 1997; 6, 383-385.

Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA. Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature.* 1975 Dec 4;258(5534):427-9.

Taylor JH. Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics.* 1958 May; 43(3): 515–529.

Tebbs RS, Zhao Y, Tucker JD, Scheerer JB, Siciliano MJ, Hwang M, Liu N, Legerski RJ, Thompson LH. Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jul 3;92(14):6354-8.

Theodoratou E, Montazeri Z, Hawken S, Allum GC, Gong J, Tait V, Kirac I, Tazari M, Farrington SM, Demarsh A, Zgaga L, Landry D, Benson HE, Read SH, Rudan I, Tenesa A, Dunlop MG, Campbell H, Little J. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Oct 3;104(19):1433-57.

Thomas G, Jacobs KB, Kraft P, Yeager M, Wacholder S, Cox DG, Hankinson SE, Hutchinson A, Wang Z, Yu K, Chatterjee N, Garcia-Closas M, Gonzalez-Bosquet J, Prokunina-Olsson L, Orr N, Willett WC, Colditz GA, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Diver R, Prentice R, Jackson R, Kooperberg C, Chlebowski R, Lissowska J, Peplonska B, Brinton LA, Sigurdson A, Doody M, Bhatti P, Alexander BH, Buring J, Lee IM, Vatten LJ, Hveem K, Kumle M, Hayes RB, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF Jr, Hoover RN, Chanock SJ, Hunter DJ. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1). *Nat Genet.* 2009 May;41(5):579-84.

Tomlinson IP, Dunlop M, Campbell H, Zanke B, Gallinger S, Hudson T, Koessler T, Pharoah PD, Niittymäki I, Tuupanen S, Aaltonen LA, Hemminki K, Lindblom A, Försti A, Sieber O, Lipton L, van Wezel T, Morreau H, Wijnen JT, Devilee P, Matsuda K, Nakamura Y, Castellví-Bel S, Ruiz-Ponte C, Castells A, Carracedo A, Ho JW, Sham P, Hofstra RM, Vodicka P, Brenner H, Hampe J, Schafmayer C, Tepel J, Schreiber S, Völzke H, Lerch MM, Schmidt CA, Buch S, Moreno V, Villanueva CM, Peterlongo P, Radice P, Echeverry MM, Velez A, Carvajal-Carmona L, Scott R, Penegar S, Broderick P, Tenesa A, Houlston RS. COGENT (COlorectal cancer GENEtics): an international consortium to study the role of polymorphic variation on the risk of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2010 Jan 19;102(2):447-54.

Tomlinson IP, Houlston RS, Montgomery GW, Sieber OM, Dunlop MG. Investigation of the effects of DNA repair gene polymorphisms on the risk of colorectal cancer. *Mutagenesis.* 2012 Mar;27(2):219-23.

Vodicka P, Soucek P, Tates AD, Dusinska M, Sarmanova J, Zamecnikova M, Vodickova L, Koskinen M, de Zwart FA, Natarajan AT, Hemminki K. Association between genetic polymorphisms and biomarkers in styrene-exposed workers. *Mutat Res.* 2001 Oct 1;482(1-2):89-103.

Vodicka P, Koskinen M, Arand M, Oesch F, Hemminki K. Spectrum of styrene-induced DNA adducts: the relationship to other biomarkers and prospects in human biomonitoring. *Mutat Res.* 2002 Jul;511(3):239-54.

Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Sanyal S, Soucek P, Haufroid V, Dusinska M, Kuricova M, Zamecnikova M, Musak L, Buchancova J, Norppa H, Hirvonen A, Vodickova L, Naccarati A, Matousu Z, Hemminki K. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis.* 2004 May;25(5):757-63.

Vodicka P, Stetina R, Polakova V, Tulupova E, Naccarati A, Vodickova L, Kumar R, Hanova M, Pardini B, Slyskova J, Musak L, De Palma G, Soucek P, Hemminki K. Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. *Carcinogenesis.* 2007 Mar;28(3):657-64. Epub 2006 Oct 6.

Vodicka P, Polivkova Z, Sytarova S, Demova H, Kucerova M, Vodickova L, Polakova V, Naccarati A, Smerhovsky Z, Ambrus M, Cerna M, Hemminki K. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of newly diagnosed cancer patients and healthy controls. *Carcinogenesis.* 2010 Jul;31(7):1238-41.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2257-61.

Vral A, Thierens H, Baeyens A, De Ridder L. Chromosomal aberrations and in vitro radiosensitivity: intra-individual versus inter-individual variability. *Toxicol Lett.* 2004 Apr 1;149(1-3):345-52.

Weinstein, I. B., & Joe, A. K. Mechanisms of disease: Oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology.* 2006. 3, 448- 457.

- Weterings E, Verkaik NS, Brüggewirth HT, Hoeijmakers JH, van Gent DC.** The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res.* 2003 Dec 15;31(24):7238-46. Erratum in: *Nucleic Acids Res.* 2010 Jun 1;38(11):3856.
- Wilson DM, Thompson LH.** Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat Res.* 2007 Mar 1;616(1-2):11-23.
- Winsey SL, Haldar NA, Marsh HP, Bunce M, Marshall SE, Harris AL, Wojnarowska F, Welsh KI.** A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res.* 2000 Oct 15;60(20):5612-6.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA.** Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2004 Dec;14(6):473-86. Review.
- Wu X, Gu J, Amos CI, Jiang H, Hong WK, Spitz MR.** A parallel study of in vitro sensitivity to benzo[a]pyrene diol epoxide and bleomycin in lung carcinoma cases and controls. *Cancer.* 1998 Sep 15;83(6):1118-27.
- Wu X, Lippman SM, Lee JJ, Zhu Y, Wei QV, Thomas M, Hong WK, Spitz MR.** Chromosome instability in lymphocytes: a potential indicator of predisposition to oral premalignant lesions. *Cancer Res.* 2002 May 15;62(10):2813-8. PubMed PMID: 12019158.
- Wu X, Hsu TC, Annegers JF, Amos CI, Fueger JJ, Spitz MR.** A case-control study of nonrandom distribution of bleomycin-induced chromatid breaks in lymphocytes of lung cancer cases. *Cancer Res.* 1995 Feb 1;55(3):557-61.
- You Z, C. Chahwan, J. Bailis, T. Hunter, and P. Russell.** ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol.* 2005 July; 25(13): 5363–5379.
- Yu GP, Zhang ZF, Hsu TC, Spitz MR, Schantz SP.** Family history of cancer, mutagen sensitivity, and increased risk of head and neck cancer. *Cancer Lett.* 1999 Nov 1;146(1):93-101.
- Zheng YL, Loffredo CA, Yu Z, Jones RT, Krasna MJ, Alberg AJ, Yung R, Perlmutter D, Enewold L, Harris CC, Shields PG.** Bleomycin-induced chromosome breaks as a risk marker for lung cancer: a case-control study with population and hospital controls. *Carcinogenesis.* 2003 Feb;24(2):269-74.
- Zhuang J, Zhang J, Willers H, Wang H, Chung JH, van Gent DC, Hallahan DE, Powell SN, Xia F.** Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res.* 2006 Feb 1;66(3):1401-8.

Citované internetové odkazy

Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation, WHO)

<http://www.who.int>

IARC, Databáze GLOBOCAN 2008

<http://globocan.iarc.fr/>

Epidemiologie zhoubných nádorů v ČR

www.svod.cz

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

<http://atlasgeneticsoncology.org>

CancerQuest

<http://www.cancerquest.org/tumor-suppressors-table.html>,

<http://www.cancerquest.org/oncogene-table.html>

Tab. 19: Souhrnné výsledky cytogenetického hodnocení a alelické diskriminační metody u nádorových pacientů.

PACIENTI						+ BLM			- BLM		SNP*	
DG	DG stat.	pohlaví	věk	kouření	Ca u příbuzných	% b. CHTA	CHTA/ b.	% b. s ≥ 12 CHTA	% b. CHTA	CHTA/ b.	XRCC3	RAD54L
C504	1	F	59	10	ano	45	0,97	2	0	0	CC	CC
C19	2	M	57	10	ano	55	1,25	0	2	0,02	CC	CC
C20	2	F	66	0	ano	33	0,98	1	1	0,01	TT	CC
C504	1	F	67	0	ano	55	1,35	2	1	0,01	TT	CT
C504	1	F	42	0	ano	46	1,07	2	3	0,03	CT	CC
C504	1	F	61	1	ano	44	1,02	1	0	0	CC	CT
C504	1	F	65	1	ano	56	1,63	2	0	0	CT	CC
C504	1	F	62	1	ano	43	0,96	2	0	0	CC	CC
C504	1	F	69	0	ano	42	1,21	1	0	0	TT	CT
C187	2	F	55	1	ano	36	1,27	3	0	0	CT	TT
C20	2	F	52	1	ne	48	1,2	4	0	0	CT	CC
C19	2	M	67	0	ano	35	0,82	2	2	0,02	CC	CC
C20	2	F	53	0	ano	38	0,93	0	1	0,01	CT	CC
C504	1	F	57	1	ne	58	1,73	3	4	0,04	CC	CC
C504	1	F	55	0	ano	58	1,42	1	2	0,02	TT	CC
C504	1	F	58	1	ne	40	0,92	2	3	0,03	CT	CC
C504	1	F	44	0	ne	50	1,38	2	2	0,02	CC	CC
C504	1	F	64	0	ano	46	1,62	3	7	0,07	CT	CC
C504	1	F	73	0	ano	63	2,28	6	3	0,03	CT	CC
C519	3	F	68	11	ne	44	1,06	0	1	0,01	CC	CC
C504	1	M	49	10	ne	52	1,53	2	3	0,03	CT	CC
C20	2	M	64	10	ne	55	1,58	3	0	0	CC	CT
C539	3	F	40	11	ano	44	1,23	3	1	0,01	CT	CC
C504	1	F	62	1	ne	59	1,81	6	1	0,01	CT	CC
C20	2	M	70	10	ano	64	1,58	1	1	0,01	CC	CC
C164	2	F	72	1	ano	50	1,53	4	0	0	CT	CT
C184	2	F	41	0	ano	68	2,56	9	2	0,02	TT	CC
C16	2	M	64	10	ne	47	1,32	4	3	0,03	TT	CT
C187	2	F	85	0	ne	69	2,53	5	2	0,02	CT	CC
C504	1	F	52	0	ano	36	0,85	2	0	0	CT	CC

PACIENTI						+ BLM			- BLM		GENOTYP*	
DG	DG stat.	pohlaví	věk	kouření	Ca u příbuzných	% b. CHTA	CHTA/b.	% b. s ≥12 CHTA	% b. CHTA	CHTA/b.	XRCC3	RAD54L
C504	1	F	62	0	ano	60	1,56	4	0	0	CC	CT
C189	2	M	71	1	ne	57	1,75	4	0	0	TT	CC
C504	1	F	45	1	ne	53	2,07	5	2	0,02	CT	CC
C20	2	F	62	1	ne	31	0,72	1	0	0	CC	CC
C679	3	M	75	10	ne	46	1,21	4	1	0,01	CC	CT
C541	3	F	57	0	ano	45	1,18	2	1	0,01	CT	CC
C501	1	F	64	1	ne	35	0,88	1	4	0,04	TT	CC
C505	1	F	60	1	ano	40	1,26	3	1	0,01	CT	CC
C504	1	F	55	0	ne	40	1,23	4	0	0	CT	CC
C252	2	F	67	1	ano	57	1,51	1	1	0,01	CT	CC
C504	1	F	56	0	ano	45	1,31	3	0	0	CC	CC
C504	1	F	69	0	ne	44	1,27	2	1	0,01	CT	CC
C539	3	F	80	0	ne	63	1,72	4	1	0,01	CC	CC
C181	3	F	34	1	ne	36	1,29	4	1	0,01	CT	CC
C61	3	M	62	0	ano	59	1,87	5	1	0,01	CT	CT
C629	3	M	58	10	ne	57	1,68	3	0	0	TT	CT
C20	2	M	57	1	ano	48	1,57	4	1	0,01	CC	CC
C250	2	F	34	0	ne	45	1,39	3	2	0,02	CC	CT
C20	2	F	78	0	ano	46	1,4	4	0	0	0	CC
C504	1	F	60	11	ano	37	0,82	2	1	0,01	CC	CC

Legenda:

DG stat.=diagnóza pro statistické hodnocení; 1=DG BRCA, 2=DG CRC, 3=DG UGC, **kouření:** 0=nekuřák, 1=kuřák, 10=přestal kouřit před pěti a více lety, 11=přestal kouřit před méně než pěti lety, **Ca u příbuzných**=nádorová onemocnění u blízkých příbuzných (sledováno po tři generace), **% b. CHTA**= procento aberantních buněk s CHTA, **CHTA/b**=průměrné množství CHTA v jedné buňce; **% b. s ≥ 12 CHTA**=průměrné procento buněk s dvanácti či více CHTA.

* jednonukleotidové záměny pro geny XRCC3 (rs861539) a RAD54L (rs1048771).

Tab. 20: Souhrnné výsledky cytogenetického hodnocení a alelické diskriminační metody u zdravých osob.

ZDRAVÉ OSOBY				+ BLM			- BLM		GENOTYP*	
vzorek č.	pohlaví	věk	kouření	% b. CHTA	CHTA/ b.	b. s ≥12 CH	% b. CHTA	CHTA/ b.	XRCC3	RAD54L
K2	M	51	10	49	1,34	2	3	0,03	0	0
K4	F	37	10	37	1,07	3	0	0	0	0
K5	M	63	0	52	1,61	3	4	0,03	0	0
K6	M	51	0	44	0,8	0	2	0,01	0	0
K11	F	91	0	59	2	4	4	0,04	CT	CC
K13	F	86	1	49	1,53	5	3	0,02	CC	CC
K15	M	60	1	60	1,63	2	2	0,01	CT	CC
K16	M	84	1	53	1,28	4	2	0,02	0	0
K17	F	80	0	57	1,48	1	3	0,03	0	0
K18	M	60	1	43	1,48	4	2	0,01	0	0
K19	M	79	1	57	1,21	0	1	0,01	0	0
K20	M	88	0	63	2,04	4	0	0	0	0
K22	F	64	0	43	1,18	2	7	0,04	CT	CC
K23	M	43	1	41	0,87	0	4	0,02	CC	CC
K25	F	83	0	55	1,67	4	2	0,01	CT	CT
K26	F	44	1	36	0,95	2	2	0,03	TT	CC
K27	F	76	0	39	1,24	3	2	0,04	CC	CT
K28	M	64	0	59	1,41	2	0	0	CC	CC
K29	F	87	0	31	0,81	2	2	0,02	TT	CC
K30	F	82	11	50	1,11	2	4	0,03	0	0
K31	M	76	10	53	1,75	4	0	0	CC	CC
K33	F	56	10	69	2,38	5	1	0,01	CT	CT
K34	F	90	11	43	1,21	2	0	0	CC	TT
K35	M	62	1	41	1,12	2	1	0,01	CT	CC
K36	F	56	10	50	1,52	2	0	0	CT	CT
K38	F	84	1	65	1,92	3	1	0,01	CC	CT
K40	F	67	0	59	1,48	2	0	0	TT	CT
K42	F	78	10	35	0,78	1	1	0,01	CT	CC
K44	M	45	0	52	1,5	3	0	0	CT	CC
K46	M	82	0	36	1,39	4	4	0,04	CT	CC

ZDRAVÉ OSOBY				+ BLM			- BLM		GENOTYP*	
vzorek č.	pohlaví	věk	kouření	% b. CHTA	CHTA/b.	b. s ≥12 CH	% b. CHTA	CHTA/b.	XRCC3	RAD54L
K48	M	16	0	40	1,17	2	1	0,01	CT	CT
K49	M	76	1	55	2,09	4	1	0,01	CT	CC
K50	F	84	1	38	0,98	0	3	0,03	CC	CC
K51	M	60	1	38	1,17	2	2	0,02	CC	CC
K52	M	40	10	38	1,11	3	3	0,03	CC	CC
K53	F	36	0	55	1,56	2	2	0,02	CC	CC
K54	F	68	1	60	1,85	2	2	0,02	CC	CC
K56	F	89	1	63	1,89	3	1	0,01	CT	CC
K57	F	70	0	52	1,68	3	2	0,02	CC	CT
K58	M	75	1	41	0,88	1	3	0,03	CC	CC
K59	F	61	0	56	2,07	6	2	0,02	CC	CC
K60	F	57	0	65	2,06	6	0	0	CT	CC
K61	F	53	0	39	1,27	4	3	0,02	CC	CC
K62	F	49	1	63	2,15	6	1	0	TT	CT
K63	F	48	0	57	1,52	2	0	0	CC	CC
K64	F	46	10	56	1,69	6	3	0,01	0	0
K65	F	35	1	57	1,31	3	0	0	CC	CC
K66	F	33	0	47	1,21	0	1	0,01	CT	0
K755	M	81	0	62	1,75	2	6	0,05	0	CC
K757	M	68	11	58	1,63	4	2	0	0	0

Legenda:

kouření: 0=nekuřák, 1=kuřák, 10=přestal kouřit před pěti a více lety, 11=přestal kouřit před méně než pěti lety, **% b. CHTA**=procento aberantních buněk s CHTA, **CHTA/b**=průmerné množství CHTA v jedné buňce.

-

* SNP v genech XRCC3 (rs861539) a RAD54L (rs1048771).