

3256
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

V PRAZE



Katedra biochemie

Diplomová práce

**ÚLOHA POLYMORFISMŮ VYBRANÝCH
BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ
V GENOTOXICITĚ A KARCINOGENEZI**

ROLE OF POLYMORPHISMS IN SELECTED
BIOTRANSFORMATION ENZYMES IN GENOTOXICITY AND
CARCINOGENESIS

Lenka Maršáková

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Pavel Souček, CSc.
Státní zdravotní ústav, Centrum pracovního lékařství,
Oddělení biotransformací

Praha 2008

Poděkování

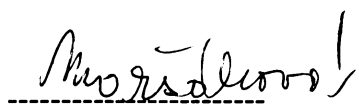
Děkuji svému školiteli RNDr. Pavlu Součkovi CSc. a celému kolektivu skupiny biotransformací jmenovitě RNDr. Radce Václavíkové, PhD, Ing. Simoně Šůsové, Ing. Miluše Hubáčkové, Ing. Marii Ehrlichové, Ing. Ivoně Hlavaté za cenné rady a pomoc při experimentální práci, vypracovávání diplomové práce a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Dále děkuji MUDr. Davidovi Vránovi, PGS na SZÚ za pomoc s izolací DNA některých vzorků ve studii pacientů a kontrol, za klinické ověření diagnóz pacientů a poskytnutí výsledků pro polymorfismus v NQO1, které umožnilo statistické zpracování studie na vyšší úrovni. Rovněž děkuji MUDr. Pavlu Vodičkovi z Ústavu experimentální medicíny, AV ČR a jeho spolupracovníkům za zpřístupnění komplexné databáze údajů týkajících se expozice, metabolismu a markerů genotoxicity styrenu a vzorků DNA exponovaných a kontrol.

Děkuji také RNDr. Viktorii Vlachové, DrSc. a RNDr. Janu Krůškovi, CSc. za cenné rady a korekci diplomové práce.

V neposlední řadě také děkuji Mgr. Kamile Burdové, Mgr. Markétě Dvořákové, všem ostatním přátelům a rodině za pomoc a psychickou oporu.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavla Součka.CSc. a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Lenka Maršáková", written over a dashed horizontal line.

Lenka Maršáková

Praha 2008

OBSAH

1. ÚVOD	- 8 -
2. TEORETICKÁ ČÁST	- 9 -
2.1. KARCINOGENEZE.....	- 9 -
2.1.1. Nádorové onemocnění pankreatu	- 10 -
2.2. GENETICKÉ ZMĚNY	- 12 -
2.2.1. Styren.....	- 15 -
2.2.1.1. Metabolismus styrenu.....	- 15 -
2.2.1.2. Genotoxické působení styrenu.....	- 17 -
2.3. POLYMORFISMUS BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ.....	- 21 -
2.3.1. Epoxidhydroláza 1	- 22 -
2.3.2. Glutathion-S-transferázy.....	- 23 -
2.3.2.1. Glutathion-S-transferáza M1	- 24 -
2.3.2.2. Glutathion-S-transferáza T1	- 24 -
2.3.2.3. Glutathion-S-transferáza P1.....	- 25 -
2.3.3. Oxidační stres	- 26 -
2.3.3.1. Superoxiddismutáza 2.....	- 28 -
2.3.3.2. Superoxiddismutáza 3.....	- 29 -
2.3.3.3. NRH: chinonoxidoreduktáza 2	- 30 -
3. CÍLE PRÁCE	- 33 -
3.1. STUDIE PŘÍPADŮ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ PANKREATU A KONTROLNÍ SKUPINY	- 33 -
3.2. STUDIE ZAMĚSTNANCŮ EXPONOVANÝCH A NEEXPONOVANÝCH STYRENU.....	- 33 -
4. MATERIÁL A METODY	- 34 -
4.1. CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH SOUBORŮ.....	- 34 -
4.1.1. Studie případů nádorového onemocnění pankreatu a kontrolní skupiny - 34 -	
4.1.1.1. Souhlas etické komise.....	- 34 -
4.1.2. Studie zaměstnanců exponovaných a neexponovaných styrenu.....	- 35 -
4.1.2.1. Souhlas etické komise.....	- 35 -
4.2. CHEMIKÁLIE.....	- 36 -
4.3. IZOLACE DNA Z KRVE	- 37 -
4.3.1. Fenol-chloroformová extrakce.....	- 37 -
4.3.2. Izolace DNA magnetickými partikulemi.....	- 37 -
4.4. GENOTYPOVÁNÍ.....	- 38 -
4.4.1. Polymerázová řetězová reakce a restriční analýza délky fragmentů	- 39 -
4.4.2. Real-time PCR	- 41 -
4.5. REAKČNÍ PODMÍNKY GENOTYPOVÁNÍ ZKOUMANÝCH ENZYMŮ - 44 -	
4.5.1. Genotypování epoxidhydrolázy 1	- 44 -
4.5.2. Genotypování glutathion-S-transferázy M1	- 46 -
4.5.3. Genotypování glutathion-S-transferáz T1 a P1	- 46 -
4.5.4. Genotypování NRH: chinonoxidoreduktázy 2	- 47 -
4.5.5. Genotypování superoxiddismutázy 2.....	- 48 -

4.5.6.	Genotypování superoxiddismutázy 3.....	- 48 -
4.6.	STATISTICKÁ ANALÝZA	- 49 -
5.	VÝSLEDKY	- 50 -
5.1.	STUDIE PŘÍPADŮ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ PANKREATU A KONTROLNÍ SKUPINY	- 50 -
5.2.	STUDIE ZAMĚŠTNANCŮ EXPONOVANÝCH A NEEXPONOVANÝCH STYRENU	- 52 -
5.2.1.	Biomarkery expozice, účinku styrenu a faktory životního stylu	- 52 -
5.2.2.	Polymorfismy sledovaných genů.....	- 57 -
6.	DISKUZE	- 61 -
6.1.	STUDIE PŘÍPADŮ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ PANKREATU A KONTROLNÍ SKUPINY	- 61 -
6.2.	STUDIE ZAMĚŠTNANCŮ EXPONOVANÝCH A NEEXPONOVANÝCH STYRENU	- 64 -
7.	ZÁVĚR	- 70 -
7.1.	STUDIE PŘÍPADŮ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ PANKREATU A KONTROLNÍ SKUPINY	- 70 -
7.2.	STUDIE ZAMĚŠTNANCŮ EXPONOVANÝCH A NEEXPONOVANÝCH STYRENU	- 70 -
8.	PŘÍLOHY	- 72 -
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 82 -

SEZNAM ZKRATEK

BN+MN	dvoujaderné buňky s mikrojádry („binucleate cells with micronuclei“)
BSA	bovinní sérový albumin
CA	chromosomální aberace
CI	konfidenční interval
CSA	chromosomový typ CA
CTA	chromatidový typ CA
CYP	cytochromy P450
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPHX1	mikrosomální epoxidhydroláza 1
FAM	fluorescenční sonda pro real-time PCR
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridizací
FRET	rezonanční přenos energie mezi fluorescenčně značenými molekulami („fluorescence resonance energy transfer“)
GLB	barevný pufr pro DNA marker („gel loading buffer“)
GST	glutathion-S-transferáza
Hb _{ad}	hemoglobinové adukty
IARC	Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny („International Agency for Research on Cancer“)
MA	kyselina mandlová („mandelic acid“)
MGB	zhášecí záření („minor groove binder“)
MN	mikrojádra („micronuclei“)
MQ	deionizovaná destilovaná voda
N	velikost souboru
NCBI	internetová databáze GeneBank („National Center for Biotechnology Information“)
NQO1	NAD(P)H: chinonoxidoreduktáza 1
NQO2	NRH: chinonoxidoreduktáza 2
NRH	N-ribosyl dihydronikotinamid
OR	relativní riziko („odds ratio“)
P	oboustranná významnost
PCR	polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)
PEG	fenylethylen glykol („phenylethylene glycol“)
PGA	fenylglyoxylová kyselina („phenylglyoxylic acid“)

PHEMA	fenyhydroxyethyl merkapturová kyselina („phenylethyl mercapturic acid“)
RCGy	reparační kapacita SSB vyvolaných γ -zářením
RCOHG	reparační kapacita SSB vyvolaných 8-oxoguaninovými adukty
RFLP	restrikční analýza délky fragmentů („restriction fragment length polymorphism“)
ROS	reaktivní kyslíkové sloučeniny („reactive oxygen species“)
SD	standardní odchylka („standard deviation“)
SDS	dodecylsulfát sodný
SNP	jednonukleotidový polymorfismus („single nucleotide polymorphism“)
SO	styren-7,8-oxid
SOD	superoxiddismutáza
SSB	jednořetězcové zlomy DNA („single strand breaks“)
SSB _{endo}	SSB vyvolané endonukleázou III
TBE	elektroforetický pufr
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VIC	fluorescenční sonda pro real-time PCR
VP	4-vinylfenol („4-vinylphenol“)
VP-G	glukuronid vinylfenolu
VP-GS	glukuronid + sulfát vinylfenolu
VP-S	sulfát vinylfenolu

1. ÚVOD

Vznik nádorového onemocnění neboli karcinogeneze je popisován jako vícestupňový proces, u něhož počet kroků a časová posloupnost nejsou zcela objasněny. Základním předpokladem je existence iniciované nádorové buňky, která vznikne nahromaděním celé řady genetických změn (mutací). Moderní epidemiologie předpokládá, že velký počet nádorových onemocnění vzniká spolupůsobením genetických faktorů a faktorů životního prostředí. Karcinogeneze je chápána jako proces vyvolaný jak dědičnými vlivy (např.: polymorfismem, jako dědičnou variací DNA vyskytující se alespoň u 1% populace), tak genotoxickým působením chemických látek jako taková byla studována z obou těchto aspektů.

Diplomová práce se zabývá jednak studií případů a kontrol nádorového onemocnění pankreatu a hodnocením vztahu polymorfismů jako faktorů individuální vnímavosti k riziku vzniku tohoto onemocnění. Karcinom pankreatu je nádorové onemocnění s velmi špatnou prognózou a Česká republika zastává jedno z předních míst ve výskytu (incidenci) tohoto onemocnění ve světě. Studie je zaměřená na možnou roli polymorfismů enzymů oxidačního stresu v rozvoji tohoto onemocnění. Oxidační stres nastává v buňce v důsledku porušení rovnováhy mezi antioxidanty a volnými radikály. Radikály mají potenciál poškozovat biologické struktury a napomáhat vzniku a rozvoji nádorového onemocnění. Enzymy zkoumané v této práci chrání buňku proti poškození těmito radikály. Přítomnost polymorfismů v genech těchto enzymů může jejich funkci narušit, a přispívat tak ke vzniku oxidačního stresu. Určení rizikových či protektivních polymorfismů by mohlo být využito k cílenému vyhledávání rizikových skupin populace za účelem včasné diagnostiky onemocnění, která by zaručila zlepšení prognózy nemocných.

Ve druhé studii byl u skupiny jedinců s definovanou expozicí látky (styrenu) vyvolávající poškození genetické informace hodnocen vztah polymorfismů ke genotoxickému působení. Sledování úlohy polymorfismů vybraných biotransformačních enzymů metabolizujících styren by mohlo vést k objasnění vlivu expozice a jejím následkům na molekulární úrovni. Případně identifikované rizikové či protektivní polymorfismy by mohly sloužit k predikci rizika vzniku poškození genetického materiálu a podrobnějšímu sledování rizikových skupin populace v souvislosti s možným rozvojem nádorových onemocnění.

Studium genetických polymorfismů může být klíčem k odhalení individuální citlivosti jednotlivce vůči působení karcinogenů a dalších faktorů, které vedou k poškození biologických makromolekul a vzniku různých druhů onemocnění. Znalost individuální citlivosti by mohla pomoci odhadnout zdravotní rizika při expozici dané látce nebo naznačit na které skupiny populace bude třeba zaměřit diagnostické programy, případně preventivní intervenci v oblasti životního stylu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. KARCINOGENEZE

Karcinogenezi je chápán vícestupňový proces vzniku a vývoje nádorového onemocnění, který lze rozdělit do třech fází: iniciace – promoce - progrese.

V iniciační fázi karcinogeneze dochází k transformaci nenádorové buňky na buňku iniciovanou. Iniciovanou buňkou je nazývána taková buňka, v které došlo k mutaci DNA vedoucí k aktivaci onkogenů, deaktivaci tumor supresorových genů a současně toto poškození nebylo opraveno reparačními enzymy. Není-li tato buňka odstraněna imunitním systémem, přetrvává v tomto stavu do té doby, než dojde k nahromadění dalších genetických změn (mutací), které vedou k proliferaci buněk s porušenou diferenciací a mezibuněčnou komunikací [Klener 1996; Stiborova a spol., 2007].

Druhou fází, neboli promoci, lze charakterizovat jako přeměnu iniciované buňky v buňku nádorovou. Tato fáze je charakteristická zvýšenou proliferací a produkcí buněk benigního nádoru. Pokud dojde k působení dalších faktorů (progresorů), dosud částečně kontrolovatelný buněčný růst se změní v růst nekontrolovatelný a vzniká maligní nádor [Stiborova a spol., 2007].

Takto pozměněné buňky přechází do fáze progrese, která se vyznačuje ztrátou schopnosti buněk odpovídat na regulační mechanismy a následuje lokální růst nádoru. V posledním stádiu nádorového bujení tzv. metastázích nastává šíření nádoru mimo prvotní ložisko a dochází k tvorbě dceřinných nádorů [Koutecký 2004].

K přeměně normální buňky na nádorovou je třeba několika nezávislých mutací, které se musí odehrát v jediné buňce, aby získala potenciál potřebný k maligní transformaci. Nádorové onemocnění je proto typickou nemocí staršího věku, protože nahromadění velkého množství somatických mutací v jediné buňce trvá mnoho let. Jedinci s vrozenou zárodeční mutací v onkogenech či tumorsupresorových genech však nepotřebují k rozvoji nádoru tolik mutací a onemocnění se u nich objevuje s vyšší frekvencí a v průměru v mladším věku [Klener, 2002].

Rozhodující roli v karcinogenezi tedy hrají mutace, respektive faktory (karcinogeny). O této problematice bude více pojednáno v kapitole 2.2.

2.1.1. Nádorové onemocnění pankreatu

Nádory pankreatu se obecně dělí na nádory exokrinní a endokrinní části. Nejčastějším nádorem exokrinní části pankreatu je duktální adenokarcinom (80%) vycházející z pankreatických vývodů. Méně časté jsou adenokarcinomy z acinárních buněk, cystadenokarcinomy a anaplastické karcinomy s výskytem každé varianty kolem 4%. Karcinom může být lokalizován ve všech částech (hlava, tělo) pankreatu. Jediná metoda, která dává pacientům šanci na vyléčení, je chirurgické odstranění nádoru, které je však účinné pouze během časného stádia onemocnění (cca 4-5% diagnostikovaných pacientů). Časné stádium je však asymptomatické, a proto většina případů tohoto onemocnění je diagnostikována až v pokročilém stádiu, v kterém chirurgický výkon již není možný. Navzdory snahám o zlepšení diagnostiky a terapie patří prognóza pacientů mezi nejhorší. Doba přežití pacientů podstupujících radioterapii a chemoterapii (např. 5-fluorouracil, gemcitabin) se pohybuje kolem šesti měsíců. Pacienti nepodstupující léčbu se dožívají kolem tří měsíců. Pětileté přežití se většinou udává pouze u 5 % pacientů. Invazivní růst, časné metastazování a rezistence k radio- a chemoterapii jsou dalšími důvody pro celkově neuspokojivou situaci [Burris a spol., 1997; Klener, 2002].

Česká republika s cca 1600 novými případy ročně patří společně s dalšími státy Střední Evropy mezi oblast s nejvyšší incidencí nádorového onemocnění pankreatu. Incidence celosvětově stále mírně stoupá a s ní stoupá i mortalita. Celosvětový standard incidence (na 100 000 lidí) byl u mužů vypočten 11,6 a pro ČR 17,6. U žen je incidence všeobecně nižší, celosvětový standard je 7,1 a v ČR činí dokonce 15,7. Incidence a mortalita jsou téměř srovnatelné [ÚZIS, 2003].

Největším problémem je neznalost vhodných specifických markerů časného stádia a rizikových faktorů, které by pomohly zlepšit prognózu [Trna a spol., 2008]. Mezi klinicky prokázané rizikové faktory nádorového onemocnění pankreatu patří vyšší věk, kouření a příslušnost k určité etnické skupině. Většina pacientů (90%) je starších 55 let. V ČR bylo v roce 2003 evidováno nejvíce případů mezi 50 - 84 lety [ÚZIS, 2003]. Karcinom pankreatu je také diagnostikován 2-3x častěji u kuřáků [www.cancer.org]. Častější incidence onemocnění byla pozorována u Afroameričanů a Maorů na Novém Zélandu [Lowenfels a Maisonneuve 2006].

Jako nezávislý rizikový faktor jak familiární (5-10% případů), tak sporadické formy adenokarcinomu je sledována chronická pankreatitida [Whitcomb a Pogue-Geile, 2002]. Spojovacím článkem, který by mohl být jedním z vysvětlení potenciálního vývoje chronické pankreatitidy v nádorové onemocnění, je mutace v K-ras onkogenu, která byla nalezena u 70-95% pacientů s oběma typy onemocnění [Saif a spol., 2007]. Chronické zánětlivé procesy, jako jsou pankreatitidy, jsou provázány zvýšeným oxidačním stresem, který může být následkem právě mutace K-ras onkogenu, což bylo potvrzeno i ve studiích provedených na buněčných liniích transfekovaných tímto onkogenem [Yang a spol., 2001].

Expozice oxidačnímu stresu je obecně spojována s poškozením buněčných membrán a genetického materiálu vedoucím k celé řadě onemocnění včetně nádorového. Cullen a spol., (2003) potvrdili úlohu radikálů resp. oxidačního stresu u nádorového onemocnění pankreatu. Superoxidový anionradikál ($O_2^{\cdot-}$) zde byl navržen jako pravděpodobný druhý posel podporující buněčnou proliferaci nádorových buněk. $O_2^{\cdot-}$ je však v organismu produkován i za fyziologických podmínek jako vedlejší produkt metabolismu, a proto je buňka vybavena ochrannými enzymatickými systémy, které dokáží reaktivní kyslíkové sloučeniny zneškodnit či předcházet jejich vzniku a zabránit tak patologickým stavům. Některé enzymy zajišťující tuto ochranu se však v populaci vyskytují v různých genetických variantách resp. jsou polymorfni. Zůstává tedy nezodpovězená otázka, zda vůbec a do jaké míry jejich polymorfismus představuje určité riziko vzniku nádorového onemocnění. Tato studie se tedy zaměřila na sledování genetických polymorfismů enzymů oxidačního stresu jako markerů genetické predispozice právě nádorového onemocnění pankreatu, neboť dřívější pilotní studie prokázaly úlohu genetických polymorfismů biotransformačních enzymů ve vzniku jiných nádorových onemocnění [Šarmanová a spol., 2004; Menzel a spol., 2004].

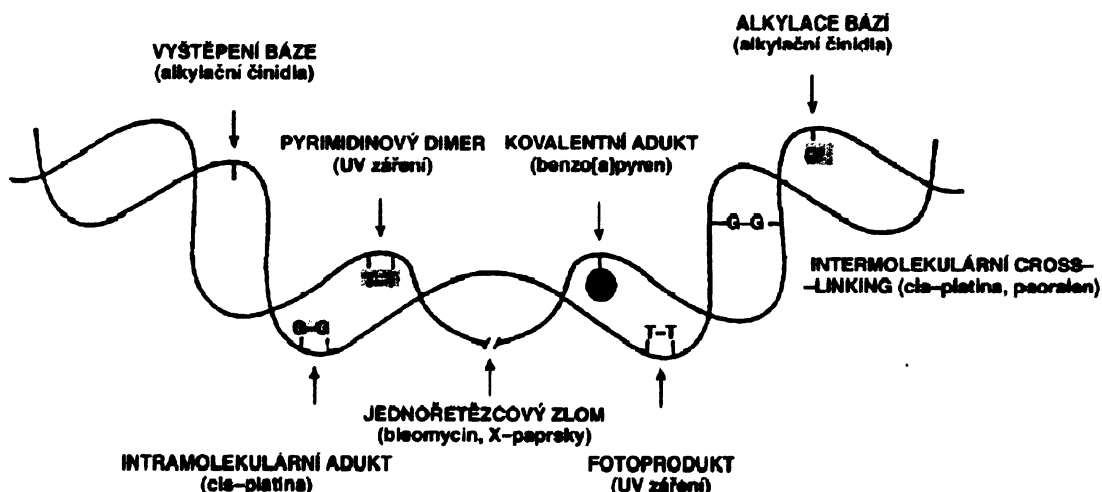
Vedle chronické pankreatitidy je dalším z dlouhodobě diskutovaných rizikových faktorů také diabetes mellitus, který se však podle výsledků některých studií ukazuje spíše jako jeden ze symptomů karcinomu pankreatu [Trna a spol., 2008].

Současné studie se také zabývají nalezením rizikových faktorů mezi faktory životního stylu, jako je pití alkoholu, černé kávy, obezita či strava (např. úprava masa při vysokých teplotách zvyšující koncentraci polycyklických aromatických uhlovodíků a heterocyklických aminů) [Li a spol., 2007; Feick a spol., 2007]. Vliv těchto faktorů na riziko vzniku karcinomu pankreatu však dosud nebyl potvrzen.

2.2. GENETICKÉ ZMĚNY

Podle vzniku lze genetické změny, neboli mutace, rozdělit na spontánní nevyhnutelné a indukované. Spontánní mutace probíhají s frekvencí 10^{-6} na gen na buněčné dělení. Tato hodnota je dána přesností replikace DNA a její opravy. Frekvence spontánních mutací je vzhledem k počtu dělení velmi nízká na to, aby sama vyvolala vznik nádorového onemocnění [Alberts, 1998].

Většina mutací je indukována faktory vnějšího prostředí (mutageny, popř. karcinogeny), které lze podle povahy rozdělit na fyzikální (např. UV, ionizující záření), chemické (např. polycyklické aromatické uhlovodíky, těžké kovy, některá cytostatika) a biologické (např. některé viry). Podle mechanismu působení lze mutageny rozdělit na genotoxické (tvoří kovalentní adukty s DNA či jiné kovalentní modifikace), epigenetické (nekovalentní interakce s DNA, např. interkalátory) a mutageny způsobující změny struktury DNA jako např. jedno- a dvouřetězcové zlomy, intra- i intermolekulární „cross-linking“ DNA vyvolávané bifunkčními činidly či „DNA-protein cross-linking“ [Stiborova a spol., 2007]. Některé z uvedených typů poškození jsou na následujícím obrázku 1.



Obrázek 1: Typy DNA poškození vyvolané faktory exogenního původu

(Převzato z [Stiborova a spol., 2007])

I přesto, že většina genetických změn je opravena reparačními systémy, může docházet k vytvoření perzistentních aduktů, které mohou způsobit permanentní mutace v regulačních genech kontrolujících růst, vedoucích k aberantnímu buněčnému vývoji a ke karcinogenním procesům. Majoritní příčina karcinogeneze je kovalentní modifikace DNA genotoxickými karcinogeny, které se váží na báze či deoxyribózu DNA, méně často dochází k apurinaci či apyrimidaci DNA, „cross-linking“, vznik hydroxyderivátů bází (vyvolávají je volné radikály kyslíku), vznik cyklických aduktů, interkalátů nebo pyrimidinových dimerů [Stiborova a spol., 2007].

Konečný vliv mutace na zdraví jedince závisí především na lokalizaci, typu mutace a zda k mutaci došlo v somatické či pohlavní buňce. Mutace v zárodečných buňkách se kromě dědičných chorob podílejí na vzniku genetické variability organismů (více kapitola 2.3.) např. zlepšením/zhoršením stávající funkce genu. Podle rozsahu lze změny v DNA rozdělit na genové, chromosomální a genomové.

Genové mutace

Genovými (bodovými) mutacemi se označují změny v sekvenci DNA na úrovni jednoho nebo více nukleotidů. Zařazení jednoho nebo více nadbytečných nukleotidových párů se označuje jako **inzerce**. O **deleci** mluvíme, dojde-li ke ztrátě jednoho nebo více nukleotidů původní sekvence. Pokud je v případě delece a inzerce odstraněn či zařazen takový počet nukleotidů, který není celočíselným násobkem 3 ($3n$), dojde k posunu čtecího rámce a následně k syntetizování zcela odlišného polypeptidu nebo dokonce k předčasnému ukončení proteosyntézy výskytem terminačního kodonu a výsledkem je zcela nefunkční protein. Dalším příkladem genové mutace je **substituce** původní báze za jinou, ke které dochází jednak v rámci purinových nebo pyrimidinových bazí a nazývá se tranzice. Substituce purinové báze za pyrimidinovou a naopak se nazývá transverze. Substituce se mohou a nemusí projevit v AMK sekvenci, neovlivňují fenotyp, ale mohou vést ke snížení či úplné ztrátě aktivity určitého enzymu [Brdička, 2001].

Chromosomální mutace (aberrace)

Chromosomálními aberacemi (CA) se nazývají změny struktury chromosomu, které vznikají jako následek nerovnoměrného „crossing-over“ a nestability chromosomů. Pokud se změna týká pouze jedné chromatidy, mluvíme o tzv. chromatidových CA (CTA). Pokud změna postihuje obě sesterské chromatidy, jedná se o chromosomový typ CA (CSA). Následky těchto změn závisí na tom, zda je i po strukturní přestavbě zachováno množství genetické informace. Pokud ne, dochází k fenotypovým projevům, které se odvíjejí od toho, která část genomu chybí nebo je strukturně poškozena, či naopak přebývá. V mnoha případech jsou však CA pro buňku letální nebo jsou dále předávány do dceřinných buněk a vedou u jedince nebo jeho potomků k velmi závažným chorobám. Za fyziologický výskyt CA se považuje 1-2 % [Brdička, 2001].

Mluvíme-li o **deleci**, mluvíme o ztrátě části chromosomu. Například u terminální delece se jedná o ztrátu konce raménka, nebo u intersticiální delece o ztrátu střední části některého z ramének chromosomu. **Inzerce** představuje přidání genetického materiálu v rámci jednoho chromosomu. Inzerce i delece se projevují ztrátou heterozygosity a mohou vést k inaktivaci tumor supresorových genů a velmi závažným klinickým projevům. Při **amplifikaci** genetického materiálu (např. duplikaci) na jednom chromosomu dochází k deleci téhož úseku na druhém chromosomu. Znásobení genetického materiálu může způsobit aktivaci onkogenu a zvýšit produkci funkčně normálního proteinu. Při **inverzi** dochází k vyštěpení části chromosomu, jejímu převrácení a následnému napojení (pokud je na invertované části chromosomu centromera - jedná se o

pericentrickou inverzi; pokud na invertovaném úseku centromera není - jde o inverzi paracentrickou). Prostřednictvím inverze dojde k přiblížení určitého genu k jinému, funkčně odlišnému, čímž může vzniknout abnormální protein. Pokud je úsek jednoho chromosomu vyštěpen a připojen k chromosomu jinému, nazýváme tento děj **translokací**. Translokace mohou být balancované (kdy je zachováno stejné množství genetické informace v buňce), nebo nebalancované (kdy původní množství není dodrženo). Počet chromosomů se během translokace však nemění. Určitý gen se může během translokace dostat pod kontrolu nového promotoru, který způsobuje onkogenní aktivaci. Translokovaný gen může produkovat protein v nadměrném množství nebo v nerelevantních situacích. Další možností je fúze s jiným genem a pak dochází k tvorbě abnormálních proteinů [Brdička, 2001]. Krajní případ CA je **fragmentace**, kdy vlivem silných mutagenů a vysoké chromosomální nestability dojde k rozpadu chromosomu na fragmenty.

Nezanedbatelný vliv na množství a hromadění genetického poškození v lidském genomu mají faktory, jako je věk (snížená reparační kapacita), životní styl resp. strava a kouření [Kao-Shan a spol., 1987; Bolognesi a spol., 1997; Ames, 2001].

Genomové mutace

Genomovými mutacemi jsou označovány změny v počtu chromosomů, a to buď celé chromosomální sady, nebo pouze v rámci homologních chromosomů. K tomuto stavu dochází při špatném rozestupu chromosomů při dělení buňky.

Kromě CA je dalším vhodným biomarkerem vypovídajícím o úrovni poškození a stabilitě genomu frekvence mikrojader (MN = micronuclei). MN jsou malá mimojaderná tělíška, která vznikají z fragmentů chromosomů, nebo z celých chromosomů. Představují struktury, které se opozdily v anafázi a nebyly zahrnuty do dceřiného jádra. Je to způsobeno zpravidla tím, že nemají centromeru, nebo došlo k poruše dělicího vřeténka. Mikrojádra se nachází v cytoplazmě vedle hlavního jádra a mají podobu malého jádérka. Výskyt MN je sledován jako prediktivní faktor vzniku nádorového onemocnění [Bonassi a spol., 2007].

Genetické abnormality jsou velmi dobrými markery při diagnostice a monitorování daného nádorového onemocnění a mohou také objasnit vliv genotoxického působení chemických sloučenin na organismus, což bylo předmětem této diplomové práce.

2.2.1. Styren

Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikovala styren (fenylethylen, vinylbenzen) jako možný lidský karcinogen skupiny 2B [IARC, 1994 a 2002] a jeho hlavní intermediát styren-7,8-oxid jako pravděpodobný lidský karcinogen skupiny 2A [IARC, 1994].

Styren je bezbarvá olejovitá kapalina s typickým štiplavým zápachem. Mezi nejvýznamnější antropogenní zdroje styrenu patří chemický a petrochemický průmysl (výroba polymerů a kopolymerů, rafinace ropy), výfukové plyny a spalování odpadů. V malém množství se styren vyskytuje i v tabákovém kouři a dokonce i v jídle uvolněný z polystyrenových obalů [Vodička a spol., 2006].

Tato studie byla zaměřena na sledování vlivu expozice styrenu na poškození DNA (genotoxicitu) se zvláštním ohledem na individuální citlivost způsobenou přítomností genetických polymorfismů v enzymech metabolizujících styren. Studie byla provedena na dobrovolnících vystavených každodenní expozici styrenu v pracovním prostředí. Styren slouží jako často sledovaná modelová látka ve studiu genotoxicity a úlohu v individuální vnímavosti [Haufronid a spol., 2002].

2.2.1.1. Metabolismus styrenu

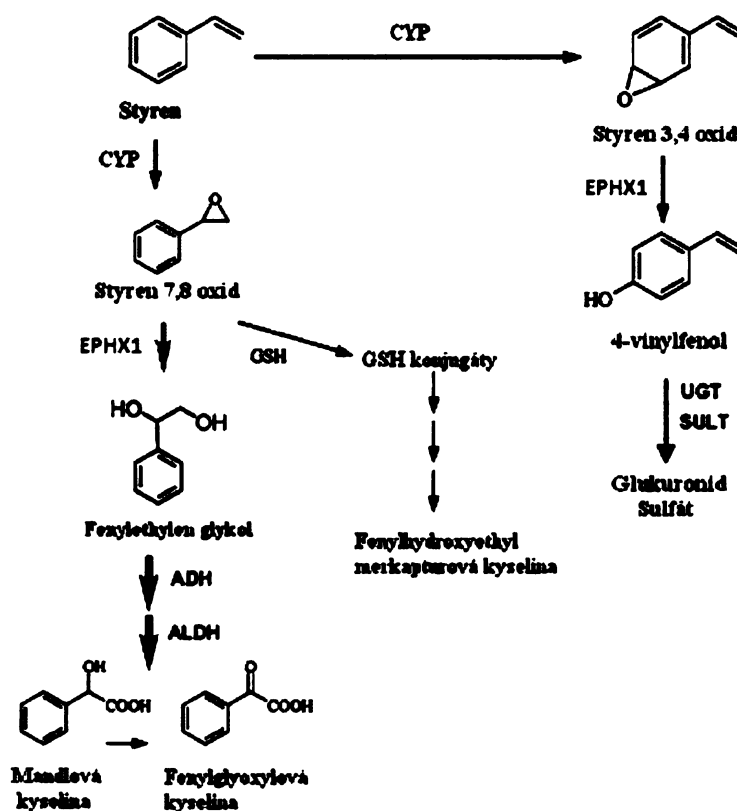
Styren se velmi dobře vstřebává plicemi a kůží a rozděluje se po celém organismu, zvláště do tukových tkání. Malá část styrenu je různými cestami vyloučena bez přeměny, většina inhalací vstřebaného styrenu je z organismu po předchozí biodegradaci vyloučena močí. Z tukové tkáně se styren vylučuje nejméně po 2-4 dny [Köhlerová, 2003].

Hlavní metabolická cesta detoxikace styrenu v lidském organismu probíhá přes intermediáty styren-7,8-oxid (**SO**), fenylethylen glykol (**PEG**) až na terminální produkty, jakými jsou kyselina mandlová (**MA**) a kyselina fenylglyoxylová (**PGA**) [Sumner a Fennell, 1994].

První zmíněný intermediát **SO** je považován za hlavního původce genotoxického/karcinogenního působení styrenu. Vzniká oxidací styrenu zprostředkovanou NAD(P)H dependentními monooxygenázami se smíšenou funkcí tzv. cytochromy P450 (**CYP**) a to především izoformami CYP2E1, CYP2C8, CYP2B6, CYP2F1 a CYP3A4 [Nakajima a spol., 1994]. **SO** je dále epoxidhydrolázou 1 (**EPHX1**) hydrolyticky štěpen na méně reaktivní **PEG**. **EPHX1** představuje hlavní detoxikační enzym styrenu, jehož aktivita je důležitým faktorem ovlivňujícím riziko genotoxického působení styrenu. Enzym s nízkou aktivitou nemusí stačit odstraňovat všechny vzniklý reaktivní styren oxid a jeho následná akumulace v organismu představuje riziko poškození biologických makromolekul [Oesch, 1973].

Posledním krokem hlavní detoxikační cesty styrenu je přeměna PEG alkohol- a aldehyddehydrogenázami na již zmíněné terminální produkty MA a PGA. Tyto dvě kyseliny tvoří u člověka více než 90% z celkového množství metabolitů styrenu. PEG se může také vázat na kyselinu glukuronovou za vzniku glukuronidu a MA se v přítomnosti ATP může konjugovat s glycinem za vzniku kyseliny hippurové [Johanson a spol., 2000].

SO je kromě výše zmíněných majoritních metabolitů odbouráván také konjugací s glutathionem na konečný produkt fenylhydroxyethyl merkapturovou kyselinu (**PHEMA**). Tato reakce katalyzovaná glutathion-S-transferázami představuje minoritní cestu detoxikace styrenu, v které PHEMA tvoří pouhé 1% metabolitů styrenu. Důležitější význam tato metabolická cesta možná představuje pro extrahepatální tkáň s nízkou aktivitou EPHX1, např. pro plíce, které jsou hlavní branou vstupu styrenu do organismu. V malém množství je SO také přeměňován na 1- a 2-fenylethanol [Vodička a spol., 2001].



Obrázek 2: Schéma metabolických cest styrenu

Vysvětlivky: ADH = alkoholdehydrogenáza; ALDH = aldehyddehydrogenáza; CYP = cytochrom P450; EPHX1 = epoxidhydroláza 1; GST = glutathion-S-transferáza; SULF = sulfotransferáza; UGT = UDP: glukuronosyltransferáza, (Převzato a upraveno z [Vodička a spol., 2006; Manini a spol., 2003])

Kromě majoritního intermediátu styren-7,8-oxidu (SO) vzniká oxidací styrenu v minimálním množství také styren-3,4-oxid, jehož metabolity představují přibližně 0,5-1% z celkového množství styrenových metabolitů. Styren-3,4-oxid je metabolizován na 4-vinylfenol (VP) a konjugován za vzniku glukuronidu (VP-G) nebo sulfátu (VP-S) [Watabe a spol., 1982]. Jakou mírou případně přispívá styren-3,4-oxid k celkové genotoxicitě styrenu není objasněno [Manini a spol., 2003]. Schéma metabolických přeměn styrenu je uvedeno na obrázku 2. Množství 4-VP a jeho konjugátů stejně jako MA, PGA, PHEMA v moči se využívají jako markery vnitřní expozice styrenu a jako ukazatel individuální metabolické kapacity.

2.2.1.2. Genotoxické působení styrenu

Předpokládaná genotoxicita styrenu spočívá především v jeho metabolické aktivaci na SO. Molekulární mechanismy genotoxického působení a úlohy styrenu v karcinogenezi nejsou v současnosti plně objasněny [Vodička a spol., 2006].

K nalezení těchto zákonitostí je využíváno sledování specifických DNA aduktů a v našem případě jimi vyvolané změny (genotoxické biomarkery). Pokud nejsou poškozená místa správně opravena, mohou během replikace vést k inzerci nesprávné báze a poskytnout tak mutovaný templát pro transkripci a translaci vedoucí k syntéze aberantního proteinu. Pokud k těmto změnám dojde v onkogenu, tumor supresorovém genu či v genu kontrolujícím buněčný cyklus, může dojít ke vzniku iniciované nádorové buňky [Masopust a Průša, 2003].

DNA adukty styrenu

DNA adukty reprezentují prekurzory genetického poškození, které odráží individuální expozici, metabolickou a reparační kapacitu organismu. SO se kovalentně váže na nukleofilní místa DNA prostřednictvím α (na exocyklické amino skupiny bází) nebo β -uhlíku (na dusík aromatických kruhů purinů a pyrimidinů). Hlavním cílem alkylace SO je guanin v pozici N7, následuje pozice N2 a O6. Pozice N7 je atakována převážně β -uhlíkem, ostatní pozice především uhlíkem α . Adenin je nejčastěji alkylován v pozici N3, N1 a N6. Atak cytosinu je nejčastější v pozici N3, N4, O2 a thymin je alkylován minimálně, a to v pozici N3, O4. Adukty SO byly nalezeny i na fosfátu [Koskinen a spol., 2000; Vodicka a spol., 2002].

Některé adukty jsou opraveny přímo O⁶-alkyltransferázou, jiné excizní reparací. Pokud nejsou opraveny včas, mohou způsobovat SSB, mutace, chyby v párování bází a CA, které vedou k zastavení replikace, buněčné smrti, nebo naopak k zhoubnému bujení [Vodicka a spol., 2002].

Sledované biomarkery genotoxického účinku

U sledované populace bylo měřeno množství jednořetězcových zlomů (SSB), které lze považovat za promutagenní léze vznikající v místech navázání aduktů, abazických místech i jako intermediát buněčné reparační. Kromě celkového počtu SSB bylo sledováno také množství SSB

vyvolaných pouze endonukleázou III (SSB_{endo}), která rozeznává a štěpí abazická místa a oxypyrimidiny. Jako hlavní genotoxické markery byly sledovány frekvence CA s ohledem na chromosomový CSA a chromatidový CTA typ a dvoujaderné buňky s mikrojádry (BN+MN).

Závěry studií zabývajících se vztahy mezi expozicí styrenem a výskytem DNA poškození jsou nejednoznačné. Většina *in vivo* a *in vitro* studií se shoduje na schopnosti styrenu tvořit adukty a SSB. Ale závěry studií zabývajících se závislostí expozice styrenu na genotoxickém poškození jsou velice sporné [Henderson a Speit, 2005].

Reparační kapacita

K celkovému pohledu na problematiku genotoxického dopadu expozice styrenu na organismus nesmí chybět schopnost opravy vzniklých poškození DNA. V rámci této práce byla sledována reparační kapacita dvojího typu. Za prvé se jednalo o reparační kapacitu, představující množství opravených SSB (pravděpodobně vystřižením bází) vyvolaných γ -zářením (RCGy) 40 minut po ozáření [Vodicka a spol., 2003]. V druhém případě bylo sledováno množství opravených SSB po vyvolání oxidačního poškození 8-oxoguaninových adduktů (RCOHG) v jádrech HeLa buněk, která byla v přítomnosti fotosenzitizéru vystavena expozici fluorescenční lampy a inkubována s buněčným extraktem monojaderných lymfocytů. Množství opravených řetězových zlomů bylo tedy ukazatelem reparační kapacity enzymových systémů. Stanovení reparačních kapacit bylo provedeno na periferních krevních lymfocytech [Collins a spol., 2001].

Metody stanovení genetického poškození

Genetická poškození SSB, SSB_{endo} a reparační kapacita RCOHG, RCGy byla detekována pomocí jednobuněčné gelové elektroforézy, která umožňuje vyhodnocení poškození a opravy na úrovni jediné buňky. DNA z lyzovaných buněk je zakotvena v agarózovém mikrogelu a migruje v elektrickém poli. Poškozená DNA, která je elektroforetickým pufrem denaturována, se rozvine a putuje rychleji než intaktní DNA. Rychlost migrace DNA v elektrickém poli závisí na počtu zlomů a velikosti molekuly DNA. Protože migrující DNA připomíná pod fluorescenčním mikroskopem ocas komety byla tato metoda pojmenována „comet assay“. Analýzou obrázků lze získat kvantitativní zhodnocení rozsahu poškození (délka a intenzita ocasu komety) [Collins a spol., 2008].

Jednou z metod, kterými se hodnotí CA, je metoda barvení Giemsovým barvivem. Při této metodě jsou chromosomy pozorované v metafázi stejnoměrně fialově obarveny. Toto barvení neumožní rozlišení všech jednotlivých chromosomů. Detekovány jsou proto jen některé strukturální aberace, např. chromatidové výměny a fragmenty chromosomů. Barvení poskytuje informace o místech, kde dochází přednostně ke zlomům. CA se hodnotí v periferních lymfocytech, které byly kultivovány po dobu 48 hodin. Sledování probíhá v prvních indukovaných

mitózách, jelikož pozdější hodnocení by bylo ovlivněno selekcí poškozených buněk (rychlost buněčného obratu) a uplatněním reparačních systémů [Komárek a spol., 2003].

Fluorescence *in situ* hybridizací (FISH) je rychlá metoda pro rozpoznání CA, využívající speciálního selektivního barvení, které umožní pod fluorescenčním mikroskopem rozlišit jednotlivé páry chromosomů. FISH umožňuje detekovat stabilní strukturní aberace, které nezpůsobují ztrátu chromosomového materiálu (např. translokace) a jsou často odrazem dlouhodobé expozice genotoxickým látkám [Komárek a spol., 2003].

Mikrojádra (MN) se detekují v lymfocytech, které prošly pouze jedním buněčným dělením, na jehož konci je inhibováno cytochalasinem b. Lymfocyty jsou pak velké, dvoujaderné (BN) a počet MN se v nich hodnotí jako frekvence na 1000 buněk [Migliore a spol., 1999].

Riziko genotoxického působení styrenu je pravděpodobně závislé na celé řadě faktorů jako např. rozsahu, délce expozice, individuální vnímavosti (genetický polymorfismus) a kapacitě reparačních systémů [Vodicka a spol., 2001, 2004; Vodička a spol., 2006; Naccarati a spol., 2006].

Expozice

Genotoxické působení styrenu je často studováno na zaměstnancích v průmyslu, v našem případě na zaměstnancích laminárny, neboť jsou vystaveni vysokým dávkám styrenu. V České republice platí přípustný expoziční limit PEL jako nejvyšší přípustná koncentrace NPK-P pro styren v ovzduší pracovišť dle nařízení vlády č. 178/2001 Sb. 100 400 mg/m³.

In vitro pokusy stanovily genotoxický práh SO 50 μ M, pod touto hranicí nebyla genotoxicita již pozorovatelná. *In vivo* tato hranice stanovena nebyla [Vodička a spol., 2006].

Individuální vnímavost

Individuální vnímavost v podobě přítomnosti genetických polymorfismů enzymů metabolizujících styren s sebou přináší riziko genotoxického poškození ve formě zvýšení metabolické aktivity či snížení detoxikační kapacity vůči styrenu. K predikci rizika je zapotřebí určit rizikové genotypy a jejich kombinace ve vztahu k biomarkerům expozice a genotoxického účinku. Toto bylo a je cílem celé řady studií, jejichž závěry nejsou jednoznačné. Diskutované vztahy mezi polymorfismy a genotoxickými markery styrenu v literatuře jsou uvedeny v rámci každého studovaného enzymu v kapitole 2.3.

Kromě polymorfismů nelze jako další faktory individuální vnímavosti opomenout další faktory, jakými jsou např. faktory životního stylu, které by mohly v mnohých případech samy o sobě ovlivňovat aktivitu enzymů či v kombinaci s polymorfismy danou změnu umocňovat. Mezi faktory, které byly součástí analýzy, patřil věk, pohlaví, kouření a délka pracovního poměru. Role těchto faktorů v genotoxicitě styrenu jsou však zatím velmi diskutabilní [Vodicka a spol., 2002].

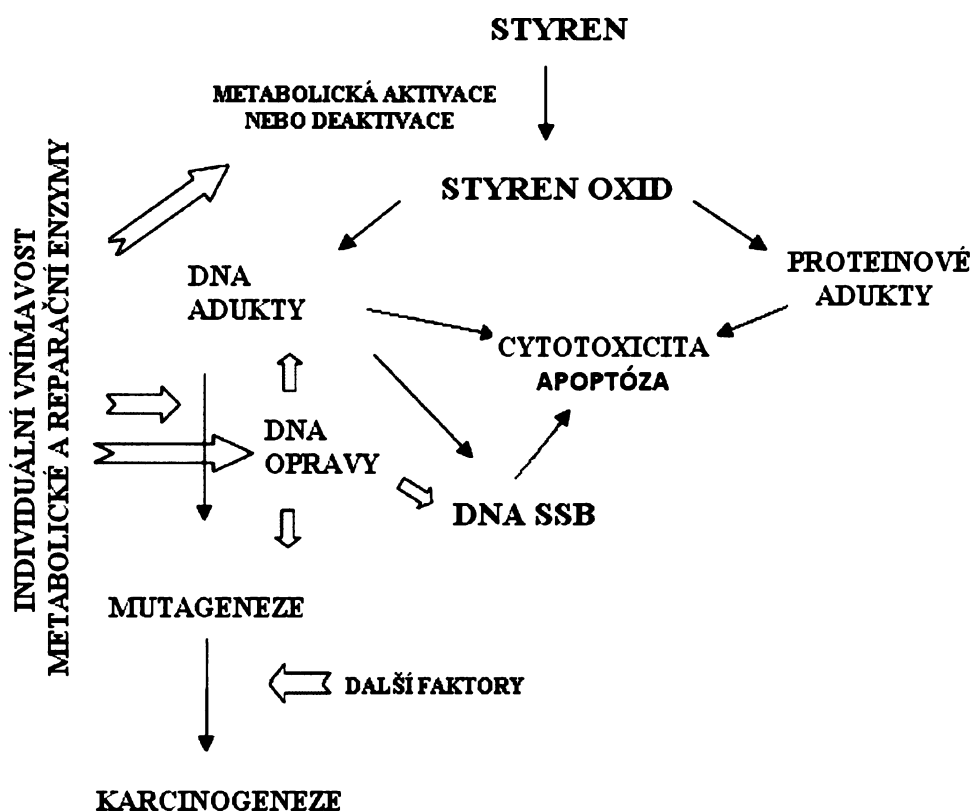
Riziko ke genotoxickému poškození styrenem by mohlo být ovlivněno také přítomností polymorfismů v genech reparačních enzymů, které však nebyly předmětem studia této práce.

Hemoglobinové adukty

Styren oxid kromě aduktů DNA může alkylovat i nukleofilní místa aminokyselin. Sledování proteinových aduktů představuje stabilní ukazatele vnitřní expozice určité látky, neboť ve srovnání s DNA adukty nejsou enzymaticky odstraňovány.

Příkladem je sledování množství N - terminálních valinových SO aduktů hemoglobinu (**Hb_{ad}**), které tedy slouží nejen jako marker vnitřní expozice styrenu, ale i jako indikátor schopnosti SO atakovat nukleofilní místa. Adukty jsou stanovovány pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Významná korelace množství Hb_{ad} styrenu u exponovaných zaměstnanců byla nalezena v řadě studií [Teixeira a spol., 2007 a 2008].

Metabolická aktivace styrenu tedy může představovat cytotoxické poškození biologických molekul vedoucí k buněčné smrti (apoptóze) nebo k mutacím až po iniciaci karcinogeneze (obrázek 3).



Obrázek 3: Schéma mechanismu cytotoxického a genotoxického působení styrenu (Převzato a upraveno dle [Vodicka a spol., 2002])

2.3. POLYMORFISMUS BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ

Biotransformační enzymy zajišťují v prokaryotických i eukaryotických organizmech metabolismus jak látek endogenních (např. steroidní hormony, vitamíny, oxid dusnatý, žlučové kyseliny), tak především látek exogenních tzv. xenobiotik (např. léky, polutanty životního prostředí). Jedná se převážně o látky hydrofobní, které jsou těmito enzymy přeměněny na látky polárnější, lépe odstranitelné z organismu. Pro xenobiotika představují biotransformační enzymy především detoxikaci, která zabraňuje často velmi nebezpečným látkám v jejich akumulaci a poškození biologických molekul. U živočichů probíhají biotransformační reakce ve dvou fázích: derivatizační (I. fáze) a konjugační (II. fáze) [Daly a spol., 1993]. V I. fázi biotransformace jsou do molekul substrátů vneseny polární skupiny, které jsou následně enzymy II. fáze využity pro konjugaci s endogenními látkami (např. s glutathionem, sulfátem, kyselinou glukuronovou, glukosou, cysteinem). Vznikají polárnější produkty, které jsou snadněji vylučovány [Vineis a spol., 1999].

Kromě prospěšných detoxikačních reakcí se navíc biotransformační enzymy účastní přímo také aktivace „pro-karcinogenů“ na ultimativní mutageny a karcinogeny, které reagují s biologickými makromolekulami (DNA, RNA, proteiny, lipidy) a poškozují je [Stiborová a spol., 1999].

Většina genů biotransformačních enzymů je v populaci polymorfní a u některých existují inaktivující alely [Vineis a spol., 1999]. Polymorfismus je definován jako přítomnost určité dědičné varianty genu u minimálně 1% populace. Polymorfismy se vyznačují populačními rozdíly ve frekvenci. Vyskytují se v kódujících (exony) i v nekódujících (introny) oblastech genomu. Přítomnost polymorfismu v exonech může způsobit změny v aminokyselinových sekvencích proteinových molekul a následně ovlivnit jejich postranslační modifikace a sbalování. Polymorfismy v intronech mohou mít například vliv na sestřih RNA a pozměnit tak regulaci exprese příslušného genu. Polymorfismus může tedy ve své podstatě ovlivňovat aktivitu, afinitu či inducibilitu (zvýšení exprese enzymu opakovaným podáním xenobiotika) enzymu. Rozdíly v expresi a v odpovědi biotransformačních enzymů na přítomnost substrátu v buňce ovlivňují metabolické schopnosti jedince, což se může například projevit individuálně odlišnými poměry mezi detoxikací a aktivací potenciálních karcinogenů. Například pokud je enzym I. fáze aktivnější (vznik většího množství reaktivních intermediátů) než enzym II. fáze (pomale odstraňování reaktivních intermediátů), dochází k akumulaci reaktivních sloučenin, která přispívá k poškození biologických makromolekul [Wormhoudt a spol., 1999].

Diplomová práce byla zaměřena na sledování jednonukleotidových polymorfismů (SNP) a delečních polymorfismů u následujících biotransformačních enzymů a antioxidačních enzymů ovlivňujících rovnováhu mezi oxidanty a antioxidanty v organismu (oxidační stres).

2.3.1. Epoxidhydroláza 1

Mikrozomální epoxidhydroláza 1 (EC 3.3.2.3) (EPHX1/mEH) patří mezi enzymy I. fáze biotransformace navazující na metabolismus CYP [Daly a spol., 1993]. Mezi substráty EPHX1 patří různé druhy potenciálně genotoxických a karcinogenních aromatických či alifatických epoxidů. Tyto látky jsou hydrolyzovány na méně toxické, ve vodě rozpustné *trans*-dihydrodioly, které jsou po konjugaci s glutathionem či kyselinou glukuronovou vyloučeny z organismu [Oesch, 1973]. EPHX1 se vedle detoxikace účastní také aktivace některých prokarcinogenů [Zhou a spol., 2001]. Dobře popsáním příkladem je přeměna benzo(a)pyrenu na vysoce mutagenní 7,8-diol-9,10-epoxid [Sims a spol., 1974]. Nejvyšší exprese *EPHX1* byla nalezena v játrech, méně v plicích a lymfocytech [Omiecinski a spol., 1994].

EPHX1 je dlouhý 20,3 kbp, obsahuje devět exonů a nachází se na chromosomu 1q42.1. mRNA o délce 1,8 kbp kóduje protein o 456 aminokyselinách. V genu byla nalezena celá řada polymorfních míst. Nejčastěji studované polymorfismy se nachází v exonu 3, kde dochází k záměně thyminu za cytozin, projevující se záměnou tyrozinu za histidin (**Tyr113His**) a v exonu 4, kde byla zjištěna záměna adeninu za guanin určující změnu histidinu za arginin (**His139Arg**) (tabulka 1) [Hasset a spol., 1994b]. Mezi těmito polymorfismy byla zjištěna funkční závislost, oba mají vliv na enzymovou aktivitu. Přítomnost polymorfismu v exonu 3 snižuje aktivitu enzymu na 60% původní, naopak polymorfismus v exonu 4 ji zvyšuje o 25%. Předpokládaná celková aktivita enzymu se získá kombinací výskytu polymorfismů v obou exonech [Benhamou a spol., 1998], jak je shrnuto v tabulce 8 str. 45.

Tabulka 1: Charakteristika sledovaných polymorfismů *EPHX1*

<i>EPHX1</i> exon 3	tranzice rs1051740	*1/*3	337 T→C	113 Tyr→His	60% aktivita	Hasset a spol., 1994ab
<i>EPHX1</i> exon 4	tranzice rs2292566	*1/*4	415 A→G	139 His→Arg	125% aktivita	

Zastoupení variantní alely (His) *EPHX1* v exonu 3 v populacích

běloši:	31-33 %	[Spurdle a spol., 2007; To-Figueras a spol., 2002]
černoši:	17-20 %	[Masimirembwa a spol., 1998]
Asiaté (Číňané):	54 %	[Hasset a spol., 1994b; McGlynn a spol., 1995]

Zastoupení variantní alely (Arg) *EPHX1* v exonu 4 v populacích

běloši:	19 %	[To-Figueras a spol., 2002]
černoši:	26-30 %	[Masimirembwa a spol., 1998]

Vztah polymorfismů *EPHX1* ke genotoxicitě

Kvůli substrátové specifitě je aktivita EPHX1, resp. její polymorfismy, vhodným předmětem studia sledování vnímavosti jedince ke genotoxickému poškození chemických látek. V této studii byl modelovou látkou styren, pro který je EPHX1 hlavním detoxikačním enzymem katalyzujícím hydrolyzu genotoxického styren oxidu. V řadě studií byla u exponovaných jedinců s nízkou aktivitou EPHX1 nalezena vyšší frekvence CA ve srovnání s jedinci s vysokou aktivitou enzymu [Vodicka a spol., 2001; Musak a spol., 2008] a množství hemoglobinových aduktů [Teixeira a spol., 2007].

Aktivita EPHX1 je nejčastěji studována ve vztahu s polymorfismy v genech glutathion-S-transferáz (GST), které vedle EPHX1 zajišťují také detoxikaci styren oxidu. Některé závěry publikovaných studií jsou uvedeny dále v rámci kapitoly 2.3.2.

Vztah aktivity EPHX1 k nádorovým onemocněním

Polymorfismy v *EPHX1* určující aktivitu enzymu jsou nejčastěji diskutovány ve vztahu s karcinomem plic, neboť tento enzym zajišťuje metabolickou aktivaci karcinogenů tabákového kouře. Závěrem studie z roku 2001 bylo, že kouření je jeden z klíčových faktorů ovlivňující vliv polymorfismu EPHX1 k nádorovému onemocnění plic. Vysoká aktivita enzymu byla určena rizikovým faktorem vzniku karcinomu plic u těžkých kuřáků a protektivním faktorem u nekuřáků a slabých kuřáků [Zhou a spol., 2001].

2.3.2. Glutathion-S-transferázy

Glutathion-S-transferázy (EC 2.5.1.18) (GST) tvoří velkou rodinu cytoplazmatických enzymů zajišťujících detoxikační reakce II. fáze biotransformace. GST katalyzují konjugaci elektrofilních molekul s glutathionem (γ -glutamylcysteinylglycin) za vzniku kyseliny merkapturové, která je z organismu vylučována močí [Daly a spol., 1993]. Mezi substráty GST patří řada karcinogenů, terapeutik, toxinů a produktů oxidačního stresu, které mohou být konjugací s glutathionem nejen detoxikovány, ale v některých případech i aktivovány [Wormhoudt a spol., 1999].

GST jsou dimerní enzymy, jejichž aktivní centrum každé podjednotky obsahuje vazebné místo pro glutathion (G-místo) a vazebné místo pro elektrofilní substrát (H-místo) [Mannervik a Danielson 1988].

Kromě studovaných cytoplazmatických forem se GST vyskytují také v mikrozomech. Savčí cytoplazmatické GST jsou podle aminokyselinové sekvence rozděleny do tříd: α (GSTA), μ (GSTM), π (GSTP), κ (GSTK), ω (GSTO), θ (GSTT), σ (GSTS) a ζ (GSTZ) [Strange a spol., 2001].

V diplomové práci byl sledován polymorfismus u třech nejvíce zastoupených izoforem GST, jejichž stručná charakteristika je shrnuta v následující tabulce 2.

Tabulka 2: Charakteristika sledovaných polymorfismů *GST*

<i>GSTM1</i>	delece	null	--	--	ztráta funkce	Board a spol., 1981
<i>GSTT1</i>	delece	null	--	--	ztráta funkce	Pemble a spol., 1994
<i>GSTP1 exon 5</i>	tranzice rs1695	*1/*2	313 A→G	105 lle→Val	nižší aktivita, afinita k substrátům	Ali-Osman a spol., 1997

2.3.2.1. Glutathion-S-transferáza M1

Gen glutathion-S-transferázy M1 (*GSTM1*) je dlouhý 5,9 kbp a nachází se na chromosomu 1p13.3. Osm exonů tvoří mRNA o velikosti 1,1 kbp, která kóduje protein o 219 aminokyselinách [Zhong a spol., 1992]. V současnosti je popsáno pět genových podrodin *GSTM*, které jsou na chromosomu seřazeny v pořadí: *GSTM4* - *GSTM2* - *GSTM1* - *GSTM5* - *GSTM3*. Vlivem nerovnoměrného „crossing-over“ mezi dvěma repetitivními oblastmi dochází k deleci o velikosti 15 kbp, která zahrnuje oblast *GSTM1* [Xu a spol., 1998].

GSTM1 byl prvním, u kterého byl detekován polymorfismus [Board a spol., 1981]. Jedinci, kteří mají funkční alespoň jednu alelu se označují *GSTM1-plus* a ti, co mají obě alely deletované, jako *GSTM1-null*. Delece tohoto genu způsobuje ztrátu funkce enzymu a je v populacích velmi častá, v kavkazské populaci se výskyt pohybuje kolem 50%. *GSTM1* je nejvíce exprimována v játrech [Hayes a Strange 2000; Carlsten a spol., 2008].

Zastoupení delece *GSTM1* v populacích

běloši:	42-61 % (medián 50 %)	[Carlsten a spol., 2008]
černoši:	22-35 %	[Masimirembwa a spol., 1998; Chen a spol., 1996]
Asiaté:	36-66 % (medián 51%)	[Carlsten a spol., 2008]

2.3.2.2. Glutathion-S-transferáza T1

GSTT1 se nachází na chromosomu 22q11.2 a je dlouhý 8,1 kbp. Translací mRNA o velikosti 1 kbp vzniká protein o 241 aminokyselinách [Pemble a spol., 1994]. V genu byla nalezena delece, která způsobuje tvorbu proteinu s nulovou aktivitou. *GSTT1* je nejvíce exprimována v játrech a v ledvinách [Hayes a Strange, 2000].

GSTT1 je hlavním detoxikačním enzymem. Kromě detoxikace polutantů jakými jsou například mono- a di-halomethanu či diepoxybutanu, ethylenoxidu, zajišťuje GSTT1 také aktivační reakce prokarcinogenů jako např. methyl chloridu či bifunkčních alkylačních činidel [Hayes a Pulford, 1995].

Podobně jako u GSTM1, sledovaný jedinec má buď funkční alespoň jednu alelu a označuje se *GSTT1-plus* nebo má obě alely deletované a je označován *GSTT1-null*.

Zastoupení delece *GSTT1* v populacích

běloši:	10-24%	[To-Figueras a spol., 2002; Šarmanová a spol., 2000]
černoši:	20-26%	[Masimirembwa a spol., 1998]
Asiaté:	49 %	[Egan a spol., 2004]

2.3.2.3. Glutathion-S-transferáza P1

GSTP1 je dlouhý 2,8 kbp a nachází se na chromosomu 11q13 [Moscow, 1988]. Obsahuje sedm exonů [Cowell a spol., 1988]. Translací mRNA o velikosti 700 bp vzniká protein tvořený 211 aminokyselinami. GSTP1 je extrahepatální enzym s nejvyšší expresí v mozkové tkáni [Hayes a Strange, 2000].

V exonu 5 byla nalezena varianta adeninu za guanin, která na proteinové úrovni způsobuje v kodonu 105 záměnu isoleucinu za valin (**Ile105Val**). Variantní redukuje enzymovou aktivitu a afinitu k elektrofilním substrátům [Ali-Osman a spol., 1997].

Zastoupení variantní alely (Val) *GSTP1* v populacích

běloši:	31 %	[To-Figueras a spol., 2002]
původní austrálští obyvatelé:	11 %	[Hartus a spol., 1998]
Asiaté:	18 %	[Egan a spol., 2004]

Vztah polymorfismů *GST* ke genotoxicitě

GSTM1, GSTP1, GSTT1 byly vedle EPHX1 dalšími enzymy, jejichž polymorfismy byly v rámci této práce sledovány ve vztahu ke genotoxickému poškození styrenem. Závěry studií publikované na toto téma jsou často velmi rozporuplné.

GST zprostředkovává detoxikaci styren-7,8-oxidu (SO) prostřednictvím konjugace s glutathionem za vzniku terminálního produktu fenyhydroxyethyl merkapturové kyseliny (PHEMA). Množství tohoto metabolitu bylo popsáno v závislosti na polymorfismu GSTM1 a GSTT1. U jedinců *GSTM1-plus* bylo pozorováno 5-6 x vyšší množství PHEMA než u jedinců s delecí tohoto genu [De Palma a spol., 2001; Manini a spol., 2002].

Delece *GSTT1* podle studie De Palma a spol. (2001) nemá vliv na množství vyloučené PHEMA, ale naopak dle Haufroid a spol., (2002) snižuje množství PHEMA hned 4x.

Delece *GSTT1* [SSB, Godderis a spol., 2004] nebo kombinace delece *GSTM1* s *GSTT1* [Bernardini a spol., 2002] korelovala u zaměstnanců exponovaných styrenu také s vyšším výskytem byla SSB. V jiné studii bylo u nositelů delece *GSTT1* nalezeno také zvýšené množství SSB, ale u jedinců s delecí *GSTM1* naopak množství SSB menší [Buschini a spol., 2003]. Vyšší výskyt SSB byl také nalezen u jedinců s kombinací nízké aktivity EPHX1 a delece *GSTM1* nebo s delecí *GSTT1*. Stejně významné závislosti byly pozorovány také pro CA (nízké aktivita EPHX1 + *GSTM1-null* a + *GSTT1-null*) [Naccarati a spol., 2006].

Ve studii Slyskova a spol. (2007) byla popsána i významná závislost mezi genotypem *GSTM1-plus* a zvýšenou reparační kapacitou ve srovnání s jedinci s delecí tohoto genu.

Vztah polymorfismů *GST* k nádorovým onemocněním

Genetické varianty *GST* jsou velmi častým předmětem studia ve vztahu k nádorovým onemocněním, neboť detoxikační funkce těchto enzymů je nepostradatelná v celé řadě potenciálních karcinogenů. Spurdle a spol. (2007) stanovili jako statisticky významný rizikový faktor vzniku karcinomu prsu delecí *GSTM1*. Souhrnná analýza z roku 2003 dospěla k závěru, že rizikovým faktorem je pouze kombinace genotypů *GSTM1-null* a *GSTT1-null* pouze u žen po menopauze [Egan a spol., 2004]. Ve studii případů a kontrol nádorového onemocnění prsu české populace byla naopak za rizikový faktor určena kombinace genotypů *GSTM1-null* s alespoň jednou variantní alelou *GSTP1*. Riziko s sebou přinášela i kombinace těchto genotypů s nízkou aktivitou EPHX1 (+*GSTM1-null*) (+*GSTP1*2*) [Šarmanová a spol., 2004]. Tato kombinace genotypů se více vyskytovala také u pacientů s nádorovým onemocněním plic [Wang a spol., 2003], močového měchýře [Toruner a spol., 2001] a prostaty [Nakazato a spol., 2003] ve srovnání s kontrolní skupinou.

Další studie určila rizikovou kombinaci genotypů vysoké aktivity EPHX1 s delecí *GSTM1* při vzniku nádorového onemocnění hrtanu u bělochů [Park a spol., 2003].

Souhrnná analýza shrnující výsledky z 98 studií zjistila, že drtivá většina studií považuje genotyp *GSTM1-null* za riziko nádorového onemocnění plic u Asiatů. U kavkazské populace nebyl tento vztah nalezen [Carlsten a spol., 2008].

2.3.3. Oxidační stres

Za fyziologických podmínek je v organismu ustálena rovnováha mezi reaktivními kyslíkovými sloučeninami (ROS - Reactive Oxygen Species) a antioxidanty. V případě vzniku nadměrného množství ROS nebo nedostatečnosti antioxidační kapacity však dochází k porušení této rovnováhy ve prospěch ROS a tento stav je nazýván oxidačním stresem.

Mezi ROS patří především volné radikály, které hrají zásadní roli v iniciaci oxidačního stresu jako např. superoxidový anionradikál ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}), ale také peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná ($HClO$), ozon (O_3) či singletový kyslík (1O_2). ROS vznikají v organismu většinou jako produkt enzymových reakcí v celé řadě metabolických pochodů (např. dýchací řetězec, biotransformace v ER, metabolismus purinů, syntéza prostaglandinů). Dalším neméně významným zdrojem volných radikálů je vnější prostředí (např. ionizující záření, výfukové plyny, kouření, exhalace z průmyslu) [Racek a Holeček, 1999].

Oxidační stres představuje pro organismus veliké riziko v podobě poškození lipidů (změna fluidity a propustnosti membrán), proteinů (změny transportu iontů, změny aktivity enzymů, proteolýza) a nukleových kyselin (mutace, translační chyby, inhibice proteosyntézy). Není tedy překvapující, že je spojován s celou řadou neurodegenerativních (Alzheimerova, Parkinsonova choroba), endokrinních (diabetes), gastrointestinálních (akutní pankreatitida), vaskulárních (aterosklerosa) a v neposlední řadě s nádorovými onemocněními [Štípek a spol., 2000].

Aerobní způsob života vedl k vytvoření obranných mechanismů proti poškození ROS a to hned na třech úrovních. První spočívá v regulaci aktivity enzymů, které ROS tvoří. Druhou úrovní je záchyt a odstranění již vzniklých radikálů antioxidanty enzymové (př. superoxidodismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza) či neenzymové povahy (př. askorbát, α -tokoferol, β -karoten). Posledním způsobem ochrany organismu proti volným radikálům je oprava poškozených molekul reparačními enzymy. Snížená reparační schopnost spojená s vyšším výskytem ROS je obecně pozorována u lidí vyššího věku [Štípek a spol., 2000].

Snížení antioxidační ochrany může být způsobeno snížením aktivity antioxidačních enzymů a/nebo hladin neenzymových antioxidantů a/nebo redukčních ekvivalentů, nutných pro enzymové reakce. Současné epidemiologické studie se snaží u skupin případů určitého onemocnění zjistit přímou závislost genetických variant antioxidačních enzymů na oxidačním stresu a riziku výskytu onemocnění [Forsberg a spol., 2001].

V rámci diplomové práce byly sledovány superoxidodismutázy (SOD) (E.C. 1.15.1.1), nejprve identifikovány jako měď obsahující proteiny izolované z erytrocytů tzv. hemocuprein, erythrocuprein. Poté byl roku 1969 McCordem a Fridovichem enzym nazván SOD a charakterizován jako enzym hrající zásadní roli v ochraně aerobních organismů proti oxidačnímu poškození. SOD katalyzuje dismutaci dvou molekul superoxidových anionradikálů za vzniku peroxidu vodíku a molekuly kyslíku dle reakce (1). $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ (1)

Tato reakce probíhá velmi rychle i spontánně při $pH=7$, SOD ji ještě o čtyři řády urychluje a tím zajišťuje lepší ochranu proti radikálům [McCord a Fridovich, 1969].

$O_2^{\cdot-}$ je nejčastěji se vyskytující radikál v organismu. Vzniká jedoelektronovou redukcí molekuly kyslíku například jako produkt NADPH-oxidázy ve fagocytech, xanthinoxidasy v hepatocytech. V menší míře organismy využívají produkce $O_2^{\cdot-}$ ve svůj prospěch, jak je tomu

v případě NADPH-oxidázy, která ho využívá k zabíjení fagocytovaných bakterií a jiných organismů. $O_2^{\cdot-}$ je sám o sobě málo reaktivní a jeho nebezpečí spočívá především v tom, že z něho mohou vznikat jiné mnohem škodlivější ROS jako výše zmíněný H_2O_2 , $HClO$ či velmi silné oxidační činidlo OH^{\cdot} [Racek a Holeček, 1999].

U prokaryot i eukaryot bylo popsáno několik druhů SOD lišících se buněčnou lokalizací, primární strukturou a typem přechodného kovu ve své struktuře. Z chemického hlediska patří SOD mezi metaloproteiny, které lze dle přítomnosti atomu kovu v jejich aktivním místě označit CuZnSOD, MnSOD, FeSOD a NiSOD [web.vscht.cz/spiwokv/enzymologie/SOD].

Do současnosti byly identifikovány tři lidské formy SOD. První je $Cu^{2+}Zn^{2+}$ SOD (SOD1), vyskytující se jako homodimer v cytoplazmě prakticky všech živočišných buněk, ve vyšším množství především v erythrocytech, játrech, mozku a erythrocytech. Tato studie se zabývala SOD v mitochondriích Mn^{2+} SOD a v extracelulárním prostoru $Cu^{2+}Zn^{2+}$ SOD [Racek, 2003].

2.3.3.1. Superoxiddismutáza 2

Gen superoxiddismutázy 2 (*SOD2/MnSOD*) je lokalizovaný na chromosomu 6q25.3. *SOD2* kóduje mitochondriální enzym, který představuje první linii ochrany buňky před oxidačním poškozením. Aktivní forma enzymu je lokalizována v matrix mitochondrií jako homotetramerní protein s atomem manganu v každé podjednotce. U savců je *SOD2* nejvíce exprimována v srdci, mozku, játrech a ledvinách [Church a spol., 1992]

Zkoumaný polymorfismus byl zmapován v kodonu 16 exonu 2 a spočívá v tranzici C→T a v záměně alaninu za valin (**Ala16Val**). Tato varianta se vyskytuje v oblasti kódující signální sekvenci proteinu zajišťující cílený transport enzymu do mitochondrií. Přítomnost polymorfismu v tomto genu může pravděpodobně vést k částečnému či absolutnímu nedostatku tohoto enzymu spojenému s vystavením buňky oxidačnímu stresu [Rosenblum a spol., 1996]. Charakteristika polymorfismu *SOD2* je shrnuta v tabulce 3 str. 30.

Zastoupení variantní alely (Val) *SOD2* v populacích

běloši:	39-59 %	[Landeghem a spol., 1999; Wheatley-Price a spol., 2008; Wang a spol., 2001; Hung a spol., 2004]
černoši:	64,6%	[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/]
Asiaté:	69,7 %	[Landeghem a spol., 1999]

Vztah polymorfismu SOD2 k nádorovým onemocněním:

Genotypy *SOD2* nesoucí alespoň jednu variantní alelu (Ala/Val, Val/Val) byly ve studiích případů a kontrol určeny jako rizikový faktor vzniku karcinomu prsu [Bergman a spol., 2005] a plic [Wang a spol., 2001]. Nositelé variantního genotypu Val/Val byli také významně více zastoupeni mezi pacienty s karcinomem močového měchýře u kuřáků [Hung a spol., 2004] a s karcinomem pankreatu ve srovnání se zdravou populací [Wheatley-Price a spol., 2008]. Naopak v jiných studiích byl rizikovým faktorem karcinomu prsu [Mitrunen a spol., 2001], prostaty [Woodson a spol., 2003; Kang a spol., 2007] určen genotyp nesoucí Ala alelu.

Pokusy na liniích nádorových pankreatických buněk demonstrují významnou závislost rychlosti proliferace na množství SOD2 proteinu. V nádorových buňkách byla ve srovnání se zdravými pozorována snížená aktivita MnSOD korelující s rychlým růstem (double time) buněk. Vynucená exprese MnSOD naopak vedla ke snížení rychlosti růstu nádorových buněk [Cullen a spol., 2003; Weydert, a spol., 2003].

2.3.3.2. Superoxiddismutáza 3

Lidská superoxiddismutáza 3 (SOD3/EC-SOD) je tetramerní glykoprotein s atomem mědi a zinku v každé podjednotce. Jedná se o antioxidační enzym zodpovědný za odstranění O_2^- v extracelulárním prostoru. Protein je lokalizovaný na buněčném povrchu a v extracelulární matrix. Na buněčný povrch je SOD3 zakotvena přes heparin sulfát proteoglykanů prostřednictvím svého C-terminálního konce, který je v případě exkrece do extracelulárního matrix odštěpen [Karlsson a Marklund, 1987]. U živočichů se enzym vyskytuje v 90-99% případů v intersticiálním prostoru tkání a také v extracelulární tekutině především v plazmě, lymfě a synoviální tekutině. Nejvyšší úroveň exprese tohoto enzymu byla zjištěna v srdci, placentě, pankreatu a plicích [Folz a Crapo, 1994].

SOD3 se nachází se na chromosomu 4p15.3-p15.1 a obsahuje tři exony a dva introny. Sledovaný polymorfismus představuje substituci C→G a na proteinové úrovni záměnu argininu za glycin v kodonu 231 (**Arg231Gly**). Tento polymorfismus se nachází v C-terminální části proteinu zodpovědné za afinitu proteinu k heparinu a zvýšení množství proteinu v plazmě. Na proteinové úrovni tento polymorfismus způsobuje záměnu argininu za glycin (tabulka 3, str. 30) [Sandstrom a spol., 1994; Folz a Crapo, 1994]. Přesný biologický význam tohoto polymorfismu, který se vyskytuje s velmi nízkou četností, není ještě znám.

Zastoupení variantní alely (Gly) SOD3 v populacích

běloši:	0-0,033 %	[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/]
Hispanci:	0,048 %	[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/]
černoši:	0%	[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/]

Vztah polymorfismu *SOD3* k nádorovým onemocněním

Závislost mezi polymorfismem Arg231Gly a nádorovým onemocněním nebyla zatím prokázána. Jediná publikovaná práce zabývající se touto problematikou se týkala nádorového onemocnění prostaty [Kang a spol., 2007].

Tabulka 3: Charakteristika sledovaného polymorfismu v *SOD2* a *SOD3*

Gen	Polymorfismus	Polymorfismus	Polymorfismus	Polymorfismus	Polymorfismus
<i>SOD2</i> exon 2	tranzice rs4880	47 C→T	16 Ala→Val	Znesnadňuje transport proteinu do mitochondrií	Rosenblum a spol., 1996
<i>SOD3</i> exon 3	transverze rs1799895	637 C→G	231 Arg→Gly	Snížení afinity proteinu k buň. povrchu	Sandstrom a spol., 1994

2.3.3.3. NRH: chinonoxidoreduktáza 2

NHR: chinonoxidoreduktáza (EC 1.10.99.2) (NQO2) je stejně jako NAD(P)H: chinonoxidoreduktáza 1 (NQO1) cytoplazmatický flavinový protein, který však jako donor elektronů využívá raději N-ribosyl dihydronikotinamid (NRH), který je degradačním produktem NAD(P)H uvnitř buňky [Liao a Williams-Ashman, 1961].

Mechanismus funkce NQO2 ještě není zcela odhalen, ale vzhledem k vysoké aminokyselinové homologii s NQO1 (49%) a vysoké shodě v katalytické doméně by se dalo očekávat, že NQO2 bude stejně jako NQO1 zprostředkovávat detoxikační reakce chinonů a chinoidních sloučenin a hrát určitou roli v oxidačním stresu. V literatuře lze však nalézt pouze řadu různých hypotéz, ale skutečná funkce této reduktázy je dosud neobjasněna [Vella a spol., 2005].

NQO2 se vyskytuje ve formě homodimeru s jednou molekulou FAD. Proteinová molekula je na C konci o 43 aminokyselin kratší než NQO1 [Long a Jaiswal, 2000]. Mezi inhibitory NQO2 patří flavony jako quercetin a benzo(a)pyren, které naopak nejsou inhibitory NQO1 a je rezistentní vůči typickým inhibitorům NQO1 jako je například dikumarol [Vella a spol., 2005].

Nejvyšší exprese lidského NQO2 byla nalezena v kosterních svalech, ledvinách, játrech a v srdci, v malém množství také v mozku, pankreatu a v erytrocytech [Long a Jaiswal, 2000; Graves a spol., 2002].

NQO2 je lokalizován na chromosomu 6p25 obsahuje sedm exonů a je dlouhý 20 kbp. Lidský lokus NQO2 je vysoce polymorfní. V této práci byl sledován polymorfismus v exonu 3, jedná se o substituci thyminu za cytosin v kodonu 47, která na proteinové úrovni způsobuje záměnu fenylnalaninu za leucin (**Phe47Leu**) a snížení aktivity enzymu (tabulka 4, str. 31) [Jaiswal a spol., 1999; Jamieson a spol., 2007].

Zastoupení variantní alely (Leu) *NQO2* v populacích

běloši:	25 %	[Hubáčková; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/]
Asiaté:	26–41 %	[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/]
černoši:	0 %	[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/]

Vztah polymorfismu *NQO2* k nádorovým onemocněním

V kohortové studii karcinomů ovárií a močového měchýře byla nalezena korelace variantního genotypu se sníženou aktivitou *NQO2* ve srovnání s divokými homozygoty [Jamieson a spol., 2007]. V roce 2004 Iskander a spol. provedli pokus na *NQO2* deficientních myších, pomocí kterého prokázali úlohu *NQO2* jako protektivní faktoru v chemické karcinogenezi. U *NQO2* deficientních myší byla po expozici polycyklickými aromatickými uhlovodíky v porovnání s normálními homozygoty pozorována indukce karcinogeneze kůže [Iskander a spol., 2004].

Tabulka 4: Charakteristika sledovaného polymorfismu v *NQO2*

Gen	Polymorfismus	Identifikační číslo	Polymorfismus	Charakteristika	Studie
<i>NQO2</i> exon 3	tranzice rs1143684	14055 T→C	47 Phe→Leu	snížená aktivita variantní alely	Jamieson a spol., 2007

Kromě genotypování *SOD2*, *SOD3* a *NQO2* provedeného v rámci této práce byl vzhledem k jeho úloze v oxidačním stresu a podobnosti s *NQO2* zahrnut do statistické analýzy i polymorfismus *NQO1*.

NQO1 (EC 1.6.99.2) patří mezi enzymy I. fáze biotransformace a antioxidanty zprostředkovávající dvouelektronovou redukci chinonů za vzniku relativně stabilních hydrochinonů, které jsou většinou konjugovány s glutathionem či kyselinou glukuronovou a vyloučeny z organismu. Jednoelektronovou oxidací hydrochinonů, či jednoelektronovou redukcí chinonů mohou však vznikat cytotoxické semichinonové radikály, které jsou schopné alkylovat nukleofilní místa DNA či v přítomnosti molekulového kyslíku indukovat vznik ROS.

Sledovaný polymorfismus spočívá v substituci cytidinu za thymin, která se na proteinové úrovni projevuje záměnou prolinu za serin v kodonu 187 (**Pro187Ser**). Variantní homozygotní jedinci *2/*2 mají enzymovou aktivitu prakticky nulovou a heterozygoti *1/*2 zhruba na úrovni 30% (tabulka 5) [Traver a spol., 1997]. Úplná ztráta aktivity enzymu je pravděpodobně způsobena zvýšenou degradací mutovaného proteinu ubiquitin/ proteazomovým systémem [Siegel a spol., 2000].

Tabulka 5: Charakteristika sledovaného polymorfismu *NQO1*

Gen	Polymorfismus	Allely	Číslo báze	Číslo AAK	Účinek polymorfismu	Referenční citace
<i>NQO1</i> exon 6	tranzice rs1800566	*1/*2	609 C→T	187 Pro→Ser	ztráta aktivity	Traver a spol., 1997

Zastoupení variantní alely (Ser) *NQO1* v populacích

běloši:	21%	[Hung a spol., 2004]
černoši:	22%	[Nebert a spol., 2002]
Asiaté:	38-45%	[Naoe a spol., 2000]

SOD2, *SOD3*, *NQO2*, *NQO1* byly studovány ve vztahu k oxidačnímu stresu jako rizikovému faktoru rozvoje nádorového onemocnění pankreatu.

3. CÍLE PRÁCE

3.1. STUDIE PŘÍPADŮ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ PANKREATU A KONTROLNÍ SKUPINY

Cílem práce v první sledované skupině byla analýza polymorfismů vybraných enzymů oxidačního stresu SOD2 (Ala16Val), SOD3 (Arg231Gly), NQO2 (Phe47Leu) a NQO1 (Pro187Ser) u pacientů s nádorovým onemocněním pankreatu a kontrolní skupiny.

- Stanovit genotypy, určit jejich rozdělení a frekvenci variantních alel sledovaných enzymů v obou skupinách (*NQO1* genotypy stanoveny MUDr. Davidem Vránou v rámci jeho PGS)
- Určit, zda některý z genotypů u sledovaného enzymu nepředstavuje pro nositele riziko vzniku nádorového onemocnění pankreatu
- Určit, zda některé kombinace genotypů sledovaných enzymů nepředstavují rizikový faktor vzniku nádorového onemocnění pankreatu

3.2. STUDIE ZAMĚSTNANCŮ EXPONOVANÝCH A NEEPONOVANÝCH STYRENU

Cílem práce v druhé sledované skupině byla analýza polymorfismů vybraných enzymů metabolizujících styren EPHX1 (Tyr113His a His139Arg), GSTP1 (Ile105Val), GSTM1 (null-delece celého genu) a GSTT1 (null-delece celého genu) u exponovaných zaměstnanců a kontrolní skupiny.

- Stanovit genotypy, určit jejich rozdělení a frekvenci variantních alel sledovaných enzymů v obou skupinách
- Určit, zda je určitý genotyp nebo alela rizikovým faktorem pro vznik genotoxického poškození, respektive navrhnout vztahy určující individuální citlivost jedince k expozici styrenu
- Určit, zda existují souvislosti mezi faktory životního stylu (věk, pohlaví, kouření) a individuální citlivostí jedince ke genotoxickému poškození

4. MATERIÁL A METODY

4.1. CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH SOUBORŮ

4.1.1. Studie případů nádorového onemocnění pankreatu a kontrolní skupiny

Do studie bylo zařazeno 393 vzorků krví kontrolních osob a pacientů s nádorem pankreatu k izolaci DNA. V této skupině se nachází 180 vzorků kontrolních subjektů, 175 případů nádorů pankreatu, 15 vzorků s pankreatitidou a 22 případů, u nichž byla ověřena jiná diagnóza než karcinom pankreatu. U jednoho vzorku nebyla diagnóza k dispozici, a proto byl ze studie vyřazen spolu se vzorky s diagnózami pankreatitida nebo jinými než nádor pankreatu. Izolace DNA byla úspěšně provedena u všech vzorků. Soubor obsahoval 129 žen a 221 mužů. U 5 pacientů se pohlaví (ani věk) dosud nepodařilo zjistit. Zastoupení pohlaví se mezi pacienty a kontrolami významně nelišilo ($P = 1,000$). Naopak věkové zastoupení mezi kontrolami a pacienty se významně lišilo, kontroly byly v průměru o 6,5 roku mladší než případy ($P < 0,001$). Charakteristika sledovaného souboru je shrnuta v tabulce 6.

Tabulka 6: Charakteristika souboru nádorového onemocnění pankreatu a kontrol

Legenda: ¹⁾u 5 pacientů nebylo známo pohlaví ani věk; statisticky zhodnoceno: pohlaví - Fisherův test, věk - T-test

Charakteristika	Kontroly (n=180)	Případy (n=175 ¹⁾)	Společně (n=355 ¹⁾)
Ženy (%)	66 (36,7)	63 (37,1)	129 (36,9)
Muži (%)	114 (63,3)	107 (62,9)	221 (63,1)
Věk (roky)	55,5 ± 12,2	62,0 ± 10,8	

Vysvětlivky: SD - standardní odchylka

Vzorky byly v rámci této práce podrobeny studiu genetických polymorfismů biotransformačních enzymů: *SOD2* (Ala16Val), *SOD3* (Arg231Gly), *NQO2* (Phe47Leu).

4.1.1.1. Souhlas etické komise

Studie byla schválena Etickou komisí 1.lékařské fakulty UK v rámci grantových projektů Interní grantové agentury MZ ČR č.: 8090-3 a 9422-3.

4.1.2. Studie zaměstnanců exponovaných a neexponovaných styrenu

Do studie bylo zařazeno celkem 127 zdravých osob, zaměstnaných v průmyslu zpracování plastických hmot. Náběry byly uskutečněny v závodě lamináren v Chocni v roce 2000. V souboru bylo 41 neexponovaných úředníků (kontroly) a 86 exponovaných pracovníků s průměrnou dobou expozice 3,9 roku (rozpětí od 1 do 30 let). Studovaná populace byla složena z 45 žen a 82 mužů o průměrném věku 39 let (od 19 do 58). Kuřáci představovali ze sledovaného souboru 41 % (20% kontrol, 51% exponovaných pracovníků). Přesné zastoupení pohlaví, věku a kuřáků u kontrolní skupiny a exponovaných jedinců je shrnuto v tabulce 7. Formou komplexního dotazníku byly sledovány následující faktory: RTG v posledním roce, užívání léků, konzumace potravních doplňků (např.: vitamíny), zvláštní dietní návyky a hlavní faktory životního stylu (kouření, konzumace alkoholu a kávy). Získaná skupina reprezentuje etnicky homogenní populaci a z tohoto hlediska je vhodná pro sledování vztahu mezi biomarkery expozice (metabolity styrenu) či biomarkery poškození DNA a genetickými polymorfismy genů metabolismu cizorodých látek. Naměřené hodnoty biomarkerů byly poskytnuty Ústavem experimentální medicíny AV ČR. Odběr biologického materiálu se uskutečnil v rámci specializovaných preventivních prohlídek pracovníků. Všichni účastníci byli poučeni o účelu studie a potvrdili svým podpisem souhlas se svoji účastí ve studii (informovaný souhlas).

Tabulka 7: Charakteristika souboru exponovaných zaměstnanců styrenu a kontrolní skupiny

Legenda: statisticky zhodnoceno pohlaví a kouření - Fisherův test a věk - T-test

	Kontrolní (n=41)	Exponovaní (n=86)	Dokup (n=127)
Číslo osob	41 (32,3)	86 (67,7)	127 (100)
Pohlaví			
Muži	20 (48,8)	25 (29,1)	45 (35,4)
Ženy	21 (51,2)	61 (70,9)	82 (64,6)
Kouření			
Kouřáci	8 (19,5)	44 (51,2)	52 (40,9)
Věk (let) ± SD	45,02 ± 8,353	36,49 ± 11,959	

Vysvětlivky: SD - standardní odchylka

Vzorky byly podrobeny studiu genetických polymorfismů biotransformačních enzymů: *EPHX1* (Tyr113His a, His139Arg), *NQO1* (Pro187Ser), *GSTP1* (Ile105Val), *GSTM1* (null-delece celého genu) a *GSTT1* (null-delece celého genu).

4.1.2.1. Souhlas etické komise

Studie byla schválena Etickou komisí Ústavu experimentální medicíny AV ČR v rámci grantových projektů Grantové agentury ČR č.: 313/99/1460 a 310/03/0437.

4.2. CHEMIKÁLIE

Na přípravu všech roztoků byla použita voda prvního stupně kvality získaná přečištěním destilované vody (MQ) přístrojem Biocel A10 od firmy Millipore (Billerica, MA, USA).

Izolace DNA

ethanol ČSL2 a isopropanol (Penta, Chrudim); fenol, chloroform, proteinkináza K, 10% SDS, 5M NaCl, sacharóza, Triton X 100, EDTA, Tris, MgCl₂ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Lyzační roztok: 0,32 M sacharóza; 1% Triton; 50 mM MgCl₂; 12 mM Tris; pH=7,5

Pufr pro proteinkinázu K: 0,375 M NaCl; 0,12 M EDTA; pH=8,0

Kit BioSprint™: serinová proteáza, magnetické partikule, AL pufr, AW1 pufr, AW2 pufr, AE pufr a plastové zkumavky (Qiagen, Německo)

Real time PCR

master mix Absolute™ QPCR ROX Mix (Abgene, Thermo Scientific, UK)

TagMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)

PCR

Taq-Purple DNA polymeráza z *Thermus aquaticus*, 10x reakční pufr DNA polymerázy, MgCl₂ (Top-Bio, Praha); mix dNTP (Jena Bioscience, Německo); primery (Invitrogen, CA, USA; dodavatel KRD s.r.o., Praha), primery pro PCR (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Restrikční analýza

restrikční endonukleázy, restrikční pufr, BSA (New England Biolabs, MA, USA)

Gelová elektroforéza

agaróza (Invitrogen, CA, USA; dodavatel KRD s.r.o., Praha); 0,5x TBE pufr: Trizma, H₃BO₃, EDTA (Sigma, St. Louis, MO, USA); ethidium bromid (10μg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA); marker Phi174/HaeIII (New England Biolabs MA, USA; dodávané firmou Biotech s.r.o., Praha, ČR)

Phi174/HaeIII: 30 μl GLB (30% glycerol, 0,25% bromfenolová modř) + 8 μl enzymu Phi174/HaeIII (1μg/μl) + 62 μl MQ

0,5x TBE: 50 ml 5x TBE (27,2 g 0,45 M Trizma +13,75 g 0,45 M H₃BO₃ + 1,9 g 0,01 M EDTA/ na 0,5 l) + 450 ml MQ

Podrobnější informace o použitých chemikáliích jsou uvedeny dále v rámci jednotlivých metod.

4.3. IZOLACE DNA Z KRVE

Vzorky krve studovaných skupin byly odebírány do vakuových odběrových zkumavek Vacuette (Dialab, Praha). Vzorky byly do laboratoře dopraveny v chladovém boxu a následně byly ihned zpracovány nebo uloženy do mrazicího boxu při -80°C a zpracovány později.

4.3.1. Fenol-chloroformová extrakce

DNA skupiny zaměstnanců laminární a kontrolní skupiny byla izolována pomocí fenol/chloroformové extrakce z lymfocytů metodou podle Sugimury [Sugimura a spol., 1990].

Zamražená krev (cca 5 ml/vzorek) byla nejprve ponechána na ledu do úplného rozmražení a následně přelita do 15 ml centrifugačních zkumavek a doplněna na celkový objem 14 ml lyzačním pufrům. Krev se nechala za stálého otáčení 10 minut lyzovat na rotačním ekstraktoru (Snijders B.V., Tilburg, Holandsko) a poté byla ještě 20 – 30 min ponechána v chlazené centrifúze, kde byla každých 5 – 10 minut promíchána otočením. Následně byly vzorky 15 minut centrifugovány při 6000 RPM a 5°C na centrifúze Hermle Z360K (Gosheim, Německo; $r = 10\text{ cm}$). Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována se 4 ml sterilní MQ, opět 15 minut centrifugována při 6000 RPM a 5°C a supernatant byl opět odstraněn. Postup byl opakován s dalšími 4 ml MQ dokud peleta lymfocytů nebyla bílá.

K peletě lymfocytů bylo přidáno 800 μl pufru pro proteinkinázu K a resuspendováno, dále bylo přidáno 25 μl proteinkinázy K (20 mg/ml), 100 μl 10% SDS, 1 ml 5M NaCl a 2,4 ml sterilní MQ, vše bylo opět promícháno 10 minut na rotačním ekstraktoru. Do každé zkumavky bylo ještě přidáno 2,5 ml extrakční směsi fenol/chloroform (v poměru 1:1) a vzorky byly opět promíchávány 15 minut na rotačním ekstraktoru. Poté byly vzorky centrifugovány 15 min. při 6000 RPM a 5°C . Vrchní čirá fáze obsahující DNA byla přenesena do čisté 15 ml centrifugační zkumavky se 4 ml 99 % chladného ethanolu, kde se za opatrného promíchávání vytvořil precipitát DNA. DNA byla srážena v mrazicím boxu při -20°C přes noc. Poté byla rozmražená DNA centrifugována 15 min. při 6000 RPM 5°C , supernatant byl odstraněn a DNA byla promyta 1 ml vychlazeným 70% ethanolem a centrifugována 15 min. při stejných podmínkách. Po odstranění supernatantu byla DNA sušena při pokojové teplotě. Vysušená peleta byla rozpouštěna v 1 ml sterilní MQ několik hodin a poté byla změřena koncentrace získané DNA. Vzorky byly uchovávány při 4°C .

4.3.2. Izolace DNA magnetickými partikulemi

Pro izolaci DNA z krve pacientů s nádorem pankreatu a kontrolní skupiny byl použit přístroj „KingFisher“ (Thermo electron corporation, Vantaa, Finsko) a kit BioSprintTM. Metoda je založena na adsorpci makromolekul DNA na křemíkový povrch magnetických partikulí.

Magnetické částice s navázanou DNA jsou promyty dvěma různými pufrů, sušeny proudem vzduchu a v konečném kroku je DNA eluována do roztoku. Metoda je optimalizována na 1ml krve s maximální kapacitou přístroje 15 vzorků. Pro každý vzorek byla do přístroje umístěna plastová tuba s pěti navzájem spojenými zkumavkami.

Příprava lyzátu: Nejprve bylo smícháno 90 μ l Qiagen proteázy s 1ml krve a krátce promícháno na vortexu (IKA-Works, Wilmington, USA). Následně bylo přidáno 900 μ l AL pufru, opět 15 sekund vortexováno a 10 minut inkubováno při 70°C v suchém bloku (Techne, Staffordshire, UK). Poté bylo ke vzorkům přidáno 900 μ l isopropanolu, vše bylo 15 sekund vortexováno a 1 minutu centrifugováno při 5000 RPM na centrifuze Hermle Z360K (Gosheim, Německo).

Příprava vlastní izolace na přístroji: 1ml lyzátu byl napipetován do první zkumavky v tubě. Do zkumavky druhé byl napipetován 1 ml pufru AW1, do třetí a čtvrté zkumavky 500 μ l pufru AW2 a do poslední zkumavky 300 μ l elučního pufru AE. Do čtvrté zkumavky bylo přidáno 45 μ l zvortexované suspenze magnetických partikulí. Poté byl spuštěn program pro izolaci DNA a po 45 minutách byl z první zkumavky odebrán lyzát zbavený DNA, napipetován další 1ml zásobního lyzátu a program byl opět spuštěn. Tento postup byl opakován do vyčerpání lyzátu a poté byla z poslední zkumavky odebrána eluovaná DNA a změřena její koncentrace.

Posledním krokem izolace DNA bylo u obou metod (fenol/chloroformová extrakce, KingFisher) měření její koncentrace a čistoty na spektrofotometru Cary 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA). Absorbance byla měřena při vlnových délkách 260, 280 a 320 nm. Poměr A_{260}/A_{280} se pohyboval mezi 1,6 - 2,0. Pro výpočet koncentrace byla použita rovnice:

$$c = 50 \times A_{260-320} \times n \quad (c = \text{koncentrace v } \mu\text{g/ml}, n = \text{ředění vzorku při měření koncentrace}).$$

Dosažené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 20 - 500 μ g DNA/ml. Pro následující PCR reakce byly vzorky naředěny na koncentraci 2 μ g DNA/100 μ l a skladovány při teplotě -20°C.

4.4. GENOTYPOVÁNÍ

Pojem genotypování je používán pro proces sledování genetických polymorfismů. V této práci bylo ke genotypování využito dvou metod. U souboru zaměstnanců exponovaných styrenu a jejich kontrol byla k určení genotypů použita metoda polymerázové řetězové reakce (PCR – „Polymerase Chain Reaction“) s následnou restriční analýzou délky fragmentů (RFLP – „Restriction Fragment Length Polymorphism“). U pacientů s nádory pankreatu a kontrol byly genotypy některých enzymů stanoveny pomocí polymerázové řetězové reakce a restriční analýzou, některé metodou Real-time PCR s pomocí TaqMan sond.

4.4.1. Polymerázová řetězová reakce a restriční analýza délky fragmentů

Polymerázová řetězová reakce je využívána k amplifikaci zkoumaného úseku DNA. Mezi základní reakční složky reakce patří templát (DNA), termostabilní Taq polymeráza, reakční pufr Taq polymerázy, chlorid hořečnatý ($MgCl_2$), deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP) a dva specifické oligonukleotidy (primery). Pro navržení primerů bylo nezbytné znát alespoň část sekvence zkoumané DNA, na kterou nasedají primery. Sekvence byly zjištěny v internetové databázi GeneBank (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov).

Jednotlivé PCR reakce se lišily počtem opakování cyklů (20-35), teplotami a délkou jednotlivých kroků reakce nebo koncentrací reakčních složek. PCR reakce probíhá ve třech po sobě jdoucích krocích, které tvoří jeden cyklus:

- 1) Celková denaturace DNA při $94^{\circ}C$, 5 minut.
- 2) Nasednutí primerů při anelační teplotě, kterou bylo třeba experimentálně určit (určitým vodítkem může být teplota tání obou primerů) pro různé koncentrace $MgCl_2$.
- 3) Aktivace Taq polymerázy, připojování dNTP k primerům na základě komplementarity bází, prodlužování dceřiných řetězců při teplotě $72^{\circ}C$ (elongace).

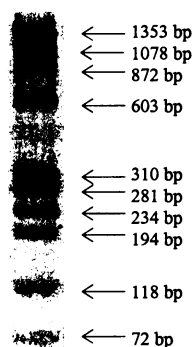
Reakce probíhaly v termocycleru GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), chemikálie byly stáčeny v minicentrifuze C1301 (Labnet, USA; dodavatel KRD s.r.o., Praha).

Obecné podmínky PCR reakce:

- Celkový objem PCR reakční směsi: $20\ \mu l$ mixu + $5\ \mu l$ ředěné DNA = $25\ \mu l$
- množství DNA: $2\ \mu g/100\ \mu l$
- koncentrace $MgCl_2$: $1,8\ mM$
- koncentrace 5x dNTP: $0,2\ mM$
- koncentrace 10x primerů: $0,25\ mM$
- Red Taq polymeráza: $0,5\ U/vzorek$
- 10x reakční pufr Top-bio /s nebo bez $MgCl_2$ /
- dH_2O (MQ)

Výsledky reakce mohly být ovlivněny celou řadou faktorů, např. koncentrací a čistotou všech složek reakce, teplotou a délkou jednotlivých kroků a počtem cyklů.

Kontrola PCR produktů byla prováděna pomocí horizontální agarózové elektroforézy ve 2 - 3% gelu. Pro přípravu gelu byly využity analytické váhy (Boeco, Německo) a agaróza byla v roztoku pufru zahřívána nad bod tání v mikrovlné troubě. Na gel bylo vždy naneseno $8\ \mu l$ PCR produktu, jako marker délky fragmentů DNA byl použit Phi174/HaeIII (obrázek 4, str. 40).



Obrázek 4: Marker délky fragmentů Phi174/HaeIII

Elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně EC-105 (Jordan Scientific Inc. JS dodané Biotech s.r.o., Praha, ČR) 30-50 minut v 0,5x ředěném pufru TBE (pH 8,0) při napětí 100V. Jako zdroj elektrického proudu byl využit Thermo EC (NY, USA dodáno KRD s.r.o., Praha, ČR). Gel byl poté barven ve vodném roztoku ethidium bromidu 15-25 minut. Fragmenty DNA byly vizualizovány pomocí UV transluminátoru (Sigma, St.Louis., MO, USA) a dokumentačního systému Kodak EDAS 290 (KRD s.r.o., Praha, ČR). Pokud kontrola produktů proběhla v pořádku, byl zbytek PCR směsi podroben restrikční analýze (s výjimkou *GSTM1* a *GSTT1*).

RFLP je založena na použití enzymů tzv. restrikčních endonukleáz, které rozeznávají specifickou sekvenci bází (obvykle čtyř až osmi deoxynukleotidů) amplifikovaného PCR úseku a specificky ji štěpí. Pro genotypování byly použity endonukleázy specifické pro očekávaný polymorfismus. Pokud tedy bylo v sekvenci přítomno polymorfní místo, endonukleázy ho rozeznaly a PCR produkt naštěpily. Výjimku tvořila endonukleáza použitá pro stanovení EPHX1-exon 3, která naopak štěpila sekvenci nemutovanou.

Restrikční pokusy probíhaly při optimálních teplotách pro aktivaci příslušné endonukleázy: 37°C ve vodním termostatu TCH 100 (Praha, ČR) nebo 55°C v inkubátoru (Biotech, Major Science, ČR).

Obecné podmínky restrikce:

- Celkový objem reakční směsi: 5μl restrikčního mixu + 15μl PCR směsi = 20 μl
- celkový objem restrikčního mixu 5 μl/vzorek
- Restrikční enzym: 1 - 2 U/vzorek
- 10x Restrikční pufr: 2μl /vzorek
- dH₂O (MQ)
- Délka a teplota restrikce: 2 hodiny, 37°C nebo 55°C

Výsledky restriční pokusu byl zjištěn pomocí horizontální elektroforézy nanesením celkového množství restriční směsi (20 μ l) na 3% agarózový gel, který byl obarven ethidium bromidem (15-25 minut). Výsledek byl zaznamenán pomocí UV transluminátoru a dokumentačního systému Kodak EDAS 290. K určení velikosti DNA fragmentů byl použit standard Phi174/HaeIII.

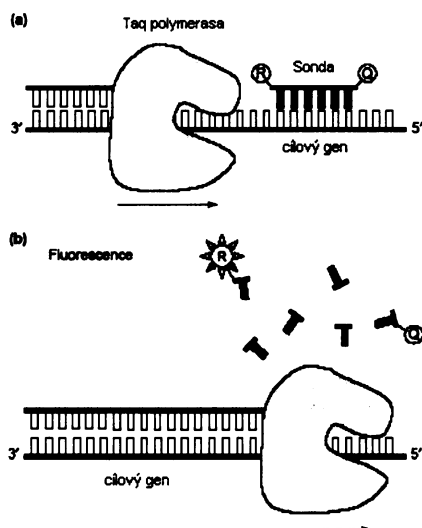
Výsledek genotypování pomocí PCR-RFLP spočíval v určení velikosti fragmentů a toho zda daný jedinec je ve sledovaném genu: **divoký homozygot** (alely nenaštěpeny x u EPHX1-exon 3 naopak naštěpeny) značen kódem **1**, **heterozygot** (naštěpena jedna alela) značen kódem **2** nebo **variantní homozygot** (obě alely naštěpeny x u EPHX1-exon 3 naopak nenaštěpeny) značen kódem **3**. V případě GSTM1 a GSTT1 pouze v určení přítomnosti **1** či delece **3** alely.

Podrobné reakční podmínky a odlišnosti od obecných podmínek reakce jsou pro každý sledovaný polymorfismus uvedeny níže v kapitole 4.5.

4.4.2. Real-time PCR

Real-time PCR je metoda založená na principu PCR s využitím fluorescence, prostřednictvím které je monitorován vznik PCR produktu v reálném čase. Zvyšující se množství produktu během reakce odpovídá naměřenému nárůstu fluorescence. Real-time PCR se využívá jako nástroj pro kvantifikaci genové exprese, genotypizaci či detekci a kvantifikaci mikroorganismů. V diplomové práci byla využita tato metoda ve spojení s Taqman sondami ke genotypizaci enzymů oxidačního stresu. Reakce probíhaly v pětikanálovém přístroji Rotor-Gene 6000 P/N65HO (Corbett Research, Sydney, Austrálie), ale využity byly pouze dva kanály.

Taqman Sondy jsou specificky navrženy duálně značené oligonukleotidy, pracující na principu rezonančního přenosu energie mezi fluorescenčně značeným (FRET - „fluorescence resonance energy transfer“) emitorem záření (fluorofor) na 5'-konci a zhášečem záření (quencher) na 3'-konci sekvence sondy. Fluorescenční látka a zhášeč záření jsou na sondě umístěny v takové vzdálenosti, při které nedochází k uvolnění záření. Taq polymeráza při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje navázanou sondu (5'→3' exonukleázová aktivita) a dochází k separaci fluorescenční látky a zhášeče. Měřený nárůst fluorescence je tedy způsoben zvýšením relativní vzdálenosti fluoroforu a zhášeče a odpovídá množství přítomného amplikonu. Na obrázku 5 je znázorněn mechanismus vzniku fluorescenčního signálu.



Obrázek 5: Mechanismus vzniku fluorescenčního záznamu během Real-time PCR

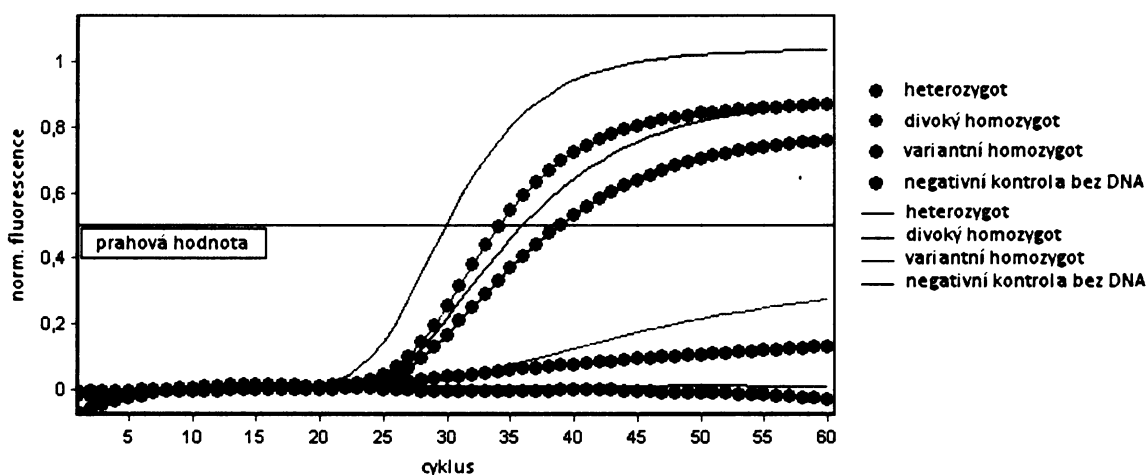
Legenda: **R** = fluorofor: emitor záření, **Q** = quencher: zhášec záření, **(a)** = hybridizace sondy s cílovou sekvencí genu, sonda je v celku nedochází k emisi záření, **(b)** = polymeráza štěpí sondu a dochází k separaci R a Q a k emisi záření, (Převzato a upraveno z [Mocellin a spol., 2003])

K určení genotypů byly použity dva typy Taqman sond, lišících se cílovou sekvencí a maximální vlnovou délkou excitace/emise jejich fluoroforů. Pro variantní sekvenci byla použita sonda s emitorem záření FAM (6-karboxy-fluorescein) a pro divokou sekvenci sonda s emitorem záření VIC. Jako zhášec záření byl u obou sond použit MGB („minor groove binder“).

Rozdílu v emisních maximech obou fluoroforů bylo využito k detekci fluorescenčního signálu v různých kanálech a následně k určení genotypů. Vyhodnocování výsledků bylo prováděno softwarem Rotor-Gene verze 6.0 (Corbett-Research, Brisbane, Australia), který podle záznamů v různých kanálech stanovil pro každý vzorek jednu z následujících možností.

<u>divoký homozygot:</u>	pozitivní fluorescenční signál produktu vázajícího sondu značenou pouze VIC – žlutý kanál (λ_{\max} excitační = 538, λ_{\max} emisní=554)
<u>variantní homozygot:</u>	pozitivní fluorescenční signál produktu vázajícího sondu značenou pouze FAM – zelený kanál (λ_{\max} excitační=495, λ_{\max} emisní=520)
<u>heterozygot:</u>	pozitivní fluorescenční signál produktu vázajícího sondu značenou VIC i sondu značenou FAM – žlutý i zelený kanál

Obrázek 6 (str. 43) představuje ukázky fluorescenčních záznamů pro jednotlivé genotypy získané z real-time PCR pokusu.



Obrázek 6: Ukázka výstupního záznamu real-time PCR pro jednotlivé genotypy

Legenda: software Rotor-Gene verze 6.0; osa x: počet cyklů; osa y: intenzita normalizované fluorescence; signál od VIC značené sondy, resp. divoká alela je značena body; signál od FAM značené sondy resp. variantní alela bez bodů; divoký homozygot, signál jen ve žlutém kanále; heterozygot, signály v obou kanálech; variantní homozygot, signál jen v zeleném kanále

Složení reakční směsi se od klasické PCR lišilo pouze přítomností specifických hybridizačních sond. DNA polymeráza, reakční pufr, $MgCl_2$, dNTP a dH_2O byly společně přítomny v zakoupeném master mixu (Absolute™ QPCR ROX Mix). Primery spolu se sondami byly použity jako komerční kit (Taqman SNP Genotyping Assay) Sekvence primerů a sond byly navrženy firmou Applied Biosystems.

Obecné podmínky Real-time PCR s využitím Taqman sond:

- Celkový objem reakční směsi: 10 μl (4,75 μl DNA + 5,25 μl mixu)
- TagMan SNP Genotyping Assay (finální koncentrace: primery 200 μM , sondy 200 μM)
 - 0,125 μl
- Master Mix 2x 5 μl
- dH_2O 0,125 μl
- DNA (0,067 $\mu g/100 \mu l$) 4,75 μl

Mezi výhody genotypování pomocí Real-time PCR metody patří především vysoká specifita daná hybridizací sond (nespecifické produkty a dimery primerů neposkytují žádný fluorescenční signál), a vysoká citlivost (stačí několikanásobně 30x nižší koncentrace DNA oproti klasické PCR). Také rychlost stanovení jednotlivých genotypů upřednostňuje tuto metodu před dosud majoritně používanými klasickými metodami sledování bodových mutací (např. RFLP). Podrobné reakční podmínky pro sledování genetických polymorfismů jsou uvedeny v následující kapitole 4.5.

4.5. REAKČNÍ PODMÍNKY GENOTYPOVÁNÍ ZKOUMANÝCH ENZYMŮ

4.5.1. Genotypování epoxidhydrolázy 1

a) Epoxidhydroláza - exon 3

Podmínky PCR

Složení:

10x pufr Top-bio /kompletní/: 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 1% Triton X-100

Primery:

EPHX1EX3-forward: 5'- GAT CGA TAA GTT CCG TTT CAC C - 3'

EPHX1EX3- reverse: 5'- AAT CTT AGT CTT GAA GTG AGG AT- 3'

Program: 1' 94°C// 35 cyklů: 30" 94°C/ 1' 30" 56°C/ 30" 72°C// 5' 72°C//∞10°C

Výsledná velikost PCR produktu 163 bp.

Podmínky restrikce

Restrikční enzym: EcoRV (20 000 U/ml) 2U/vzorek

Restrikční místo: 5'...GAT[▼]ATC...3'

3'...CTA[▲]TAG...5'

10x restrikční pufr: NEB 3: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT; pH=7,9

100x BSA 0,2 μl/vzorek

Délka a teplota restrikce: 2 hodiny při 37°C

EcoRV stěpí nemutovanou alelu, variantní zůstává nenaštěpená

Určení genotypu *EPHX1-exon 3* podle velikosti fragmentů z 3 % agarózového gelu (obrázek P1 str. 72)

- | | |
|-------------------------------------|-------------------|
| 1) divoký homozygot (Tyr113Tyr): | 140 bp + 20 bp |
| 2) heterozygot (Tyr113His): | 163 + 140 + 20 bp |
| 3) variantní homozygot (His113His): | 163 bp |

b) Epoxidhydroláza - exon 4

Podmínky PCR

Složení:

10x pufr Top-bio /kompletní/

Primery:

EPHX1EX4-forward: 5'- ACA TCC ACT TCA TCC ACG T - 3'

EPHX1EX4- reverse: 5'- ATG CCT CTG AGA AGC CAT - 3'

Program: 1' 94°C// 35cyklů: 30" 94°C/ 1'30" 60°C/ 30" 72°C// 5' 72°C// ∞10°C

Výsledná velikost PCR produktu byla 210 bp.

Podmínky restrikce

Restrikční enzym: RsaI (10 U/μl) 2U/vzorek

Restrikční místo: 5'...GT[▼]AC...3'

3'...CA[▲]TG...5'

10x pufr: Tango: 33mM Tris-acetát (Tris, EDTA, CH₃COOH, H₂O), 10mM (CH₃COO)₂Mg·4H₂O, 66 mM CH₃COOK, BSA (0,1 mg/ml)

Délka a teplota restrikce: 2 hodiny při 37°C

Určení genotypu *EPHX1*-*exon 4* podle velikostí fragmentů z 3 % agarózového gelu (obrázek P2 str. 72)

- 1) divoký homozygot (His139His): 210 bp
- 2) heterozygot (His139Arg): 210 + 164 + 46 bp
- 3) variantní homozygot (Arg139Arg): 164 + 46 bp

Aktivita EPHX1 byla odhadnuta na základě kombinací zjištěných genotypů v exonu 3 a v exonu 4 podle následující tabulky 8.

Tabulka 8: Stanovení celkové aktivity EPHX1 z kombinací genotypů v exonu 3 a 4

	Genotyp 3		Genotyp 4
nízká	*3/*3	+	*1/*1
	*3/*3	+	*1/*4
	*1/*3	+	*1/*1
	*3/*3	+	*4/*4
střední	*1/*1	+	*1/*1
	*1/*3	+	*1/*4
	*1/*3	+	*4/*4
vysoká	*1/*1	+	*4/*4
	*1/*1	+	*1/*4

Vysvětlivky: *1-divoká alela, *3 nebo *4-variantní alely v příslušných exonech

4.5.2. Genotypování glutathion-S-transferázy M1

Genotypování *GSTM1* probíhalo pomocí alel specifického PCR. Jako pozitivní kontrola PCR reakce byl použit *GSTM2*, jehož přítomnost vypovídá o správném průběhu reakce. *GSTM2* má společný primer (forward) s *GSTM1*. Nepřítomnost fragmentu *GSTM1* znamená delecí genu v obou alelách, jedná se tedy o mutovaného homozygota. Stanovení není schopno rozlišit normální homozygoty a heterozygoty, pokud je tedy přítomen fragment odpovídající *GSTM1* znamená to, že daný jedinec má k dispozici jednu nebo dvě funkční alely tohoto genu.

Podmínky PCR

Složení:

10x pufr Top-bio /kompletní/

Primery:

GSTM1-forward + GSTM2-forward: 5' - CTG CCC TAC TTG ATT GAT G -3'

GSTM1-reverse: 5' - CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC -3'

GSTM2-reverse: 5' - GAC TCA CTC TGA GCA TAG CAC -3'

Program: 30" 94°C// 20 cyklů: 30" 94°C/ 30" 68 - 48°C (pokles o 1°C v každém cyklu)/ 30" 72°C//
15 cyklů: 30" 94°C/ 30" 52°C/ 30" 72°C// 5' 72°C// ∞10°C

PCR produkty se dále neštěpily, aplikovaly se přímo na gel.

Výsledná velikost fragmentu *GSTM1* byla 275 bp a PCR kontrola *GSTM2* 175 bp.

Určení genotypu *GSTM1* podle velikosti fragmentů z 3% agarózového gelu (obrázek P3 str. 73)

- | | |
|---|--|
| 1) divoký homozygot nebo heterozygot (<i>GSTM1</i> +): | 275bp (+ 175bp <i>GSTM2</i>) |
| 3) variantní homozygot (<i>GSTM1</i> -): | delece fragmentu (+ 175bp <i>GSTM2</i>) |
| neúspěšná amplifikace: | žádný produkt |

4.5.3. Genotypování glutathion-S-transferáz T1 a P1

Genotypy *GSTP1* a *GSTT1* byly stanoveny v jedné reakci. Pro *GSTT1* byla stanovena delece či přítomnost alely. Jako pozitivní standard v případě delece alely *GSTT1* sloužil přítomný fragment *GSTP1*. Stejně jako při genotypování *GSTM1* není stanovení schopno rozlišit normální homozygoty a heterozygoty, pokud je tedy přítomen fragment odpovídající délce fragmentu *GSTT1* znamená to, že daný jedinec má k dispozici jednu nebo dvě funkční alely tohoto genu.

Pro určení delece *GSTT1* bylo použito 8 µl PCR produktu naneseného na 3% gel. Poté byla se zbývajícím množstvím PCR směsi provedena restrikce a stanoven genotyp *GSTP1*.

PCR podmínky:

Složení:

10x pufr Top-bio /bez MgCl₂/: 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 1% Triton X-100

Primery:

GSTP1-forward: 5' - TCC TTC CAC GCA CAT CCT CT - 3'

GSTP1-reverse: 5' - AGC CCC TTT CTT TGT TCA GC - 3'

GSTT1-forward: 5' - TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC - 3'

GSTT1-reverse: 5' - TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA - 3'

Program: 1' 94°C// 35 cyklů: 30" 94°C/ 30" 54°C/ 30" 72°C// 5' 72°C//∞10°C

a) Glutathion-S-transferáza T1

Výsledná velikost fragmentu *GSTT1* byla 217 bp.

Určení genotypu *GSTT1* podle velikosti fragmentů z 3 % agarózového gelu (obrázek P5 str. 74)

1) divoký homozygot nebo heterozygot (*GSTT1-plus*): 217 bp (+ *GSTP1* 294bp)

3) variantní homozygot (*GSTT1-null*): delece fragmentu 217 bp (+ *GSTP1* 294 bp)

neúspěšná amplifikace: žádný produkt

b) Glutathion-S-transferáza P1

Podmínky restrikce

Restrikční enzym: BsmAI (5000 U/ml) 2U/vzorek

Restrikční místo: 5'...GTCTC(N)₁▼...3'

3'...CAGAG(N)₅▲...5'

10x pufr: NEB 3

Délka a teplota restrikce: 2 hodiny při 55°C

Určení genotypu *GSTP1* dle velikosti fragmentů z 3 % agarózového gelu (obrázek P6 str. 74)

1) divoký homozygot (Ile105Ile): 294 bp

2) heterozygot (Ile105Val): 294 + 234 + 60 bp

3) variantní homozygot (Val105Val): 234 + 60 bp

4.5.4. Genotypování NRH: chinonoxidoreduktázy 2

PodmínkyPCR

Složení:

Koncentrace MgCl₂: 0.8 mM

10x pufr Top-bio /bez MgCl₂/

Primery:

NQO2-forward: 5'-CCT TGA AGA ATG TGG CTG TA-3'

NQO2-reverse: 5'-GTG ATA ATC CCA GTG CTA TCT A-3'

Program: 2' 94°C// 35 cyklů: 30'' 94°C/ 30'' 51°C/ 30'' 72°C// 5' 72°C// ∞ 10°C

Výsledná velikost PCR produktu 258 bp.

Podmínky restrikce

Restrikční enzym: SmlI (1U/vzorek)

Restrikční místo: 5'...C[▼]TYRAG...3'

3'...GARYT[▲]C...5'

10x restrikční pufr: NEB4: 50 mM CH₃COOK, 20mM Tris-acetát (Tris, EDTA, CH₃COOH, H₂O), 10mM (CH₃COO)₂Mg 4H₂O, 1 mM DTT, pH=7,9

100x BSA 0,2 μl/vzorek

Délka a teplota restrikce: 2 hodiny při 55°C

Určení genotypu NQO2 podle velikosti fragmentů z 3 % agarózového gelu (obrázek P4 str. 73)

- | | |
|------------------------------------|-----------------------|
| 1) divoký homozygot (Phe47Phe): | 258 bp |
| 2) heterozygot (Phe47Leu): | 258 bp + 180bp + 78bp |
| 3) variantní homozygot (Leu47Leu): | 180bp + 78bp |

4.5.5. Genotypování superoxiddismutázy 2

Ke sledování polymorfismu *SOD2* ID: rs4880 byla použita metoda Real-time PCR s TaqMan SNP Genotyping Assay ID: C_8709053_10.

Sekvence rozeznávaná sondami značenými [VIC/FAM]:

5' - TAC CCC AAA [A/G] CCG GAG CCA -3'

Sonda značená VIC rozeznává divokou sekvenci s A. Sonda značená FAM rozeznává sekvenci s variantou G.

Dle doporučení výrobce byl použit program a provedena optimalizace na teplotu 64°C, která poskytovala nejlepší rozdělení signálů: 15' 95°C// 60 cyklů: 15'' 95°C/ 15'' 64°C/

4.5.6. Genotypování superoxiddismutázy 3

Ke sledování polymorfismu *SOD3* ID: rs1799895 byla použita metoda Real-time PCR s TaqMan SNP Genotyping Assay ID: C_2307506_10.

Sekvence rozeznávaná sondami značenými [VIC/FAM]:

5' - CGC AAG AAG [C/G] GGC GGC GCG -3'

Sonda značená VIC rozeznává divokou sekvenci s C. Sonda značená FAM rozeznává sekvenci s variantou G

Dle doporučení výrobce byl použit program: 15' 95°C// 50 cyklů: 15'' 95°C/ 60'' 60°C/

4.6. STATISTICKÁ ANALÝZA

Výsledky genotypování pacientů, exponovaných zaměstnanců a jejich kontrol byly statisticky zhodnoceny. Pro statistické zpracování byly ženy označeny kódem 0 a muži byli označeni kódem 1. Kontrolní skupina ve studii případů karcinomu pankreatu a neexponovaní zaměstnanci v kohortové studii byly označeny 0 a pacienti resp. exponovaní zaměstnanci 1. Nekuřáci byli označeni 0 a kuřáci 1. Nositelé divokého genotypu – divocí homozygoti byli značeni 1, heterozygoti 2 a nositelé variantního genotypu 3. Za účelem zvýšení statistické síly studie byli jedinci navíc rozděleni na nositele divokého genotypu (1) a nositele alespoň jedné variantní alely (heterozygoti + variantní homozygoti – označení kódem 4). Kombinace genotypů byly složeny pouze z frekventních polymorfismů na základě hypotézy, že kombinace divokých alel je pozitivním faktorem a kombinace variantních alel negativním (např. *GSTM1-plus* + *GST1-plus* versus *GSTM1-null* + *GST1-null*). Statistické analýzy byly provedeny pomocí základních testů deskriptivní statistiky Pearson chi kvadrát (Fisherův exaktní test pro skupiny s méně než 40 jedinci), parametrických testů T-test a ANOVA v případě normálního rozdělení hodnot a analogicky Mann-Whitney nebo Kruskal-Wallis test pro nenormálně rozložené hodnoty.

Frekvence variantních alel byly vypočítány podle vzorce $qX = (2a + b)/2n$, kde a = počet variantních homozygotů, b = počet heterozygotů, n = počet analyzovaných jedinců. Pro statistickou analýzu obou studií byl použit program SPSS verze 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Za statisticky významné byly považovány výsledky s hodnotou oboustranné významnosti $P < 0,050$.

5. VÝSLEDKY

5.1. STUDIE PŘÍPADŮ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ PANKREATU A KONTROLNÍ SKUPINY

Jedinci s diagnostikovanou pankreatitidou, jinou diagnózou než nádorovým onemocněním pankreatu nebo neznámou diagnózou byli vyloučeni ze studie.

Rozdělení genotypů, frekvence variantních alel a odhad relativního rizika nosičství genotypů

Rozdělení genotypů a frekvence variantních alel sledovaných enzymů bylo mezi pacienty a kontrolami téměř srovnatelné. Ani po analýze rizika nosičství určitého genotypu nebyl mezi kontrolami a případy nalezen žádný statisticky významný vztah ($P < 0,050$). Zastoupení jedinců s heterozygotním genotypem bylo statisticky porovnáváno s počtem jedinců nesoucích divoký genotyp. Stejným způsobem bylo porovnáno riziko spojené s nosičstvím variantního genotypu oproti divokému a dále bylo vyjádřeno riziko nosičství aspoň jedné variantní alely (tj. buď heterozygotní nebo variantní genotyp). Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 9 na str. 51.

K vyjádření rizika spojeného s nosičstvím rizikového genotypu slouží hodnota odhadu relativního rizika (OR) a její 95% konfidenční interval (CI). Pokud je hodnota $OR > 1$ lze hovořit o zvýšeném riziku spojeném s nosičstvím sledovaného genotypu (vzhledem k divokému genotypu, který je vždy referenční). V případě, že hodnota je < 1 jedná se o protektivní genotyp. Statistickou významnost vztahu naznačila analýza CI a především hodnota oboustranné významnosti (P).

Tabulka 9: Rozdělení genotypů, frekvence variantních alel a odhad relativního rizika spojeného s nosičstvím jednotlivých genotypů zkoumaných genů u kontrol a případů

Legenda: a = referenční OR pro kombinaci genotypů 1 vs. 1; b = hodnoty získané pro kombinaci genotypů 1 vs. 2; c = hodnoty získané pro kombinaci genotypů 1 vs. 3; d = hodnoty získané pro kombinaci genotypů 1 vs. 2 nebo 3, tj. nosiči aspoň jedné variantní alely

SOD2	1 (Ala/Ala)	38 (21,1)	37 (21,1)	75 (21,1)	1,00 ^a		
	2 (Ala/Val)	83 (46,1)	94 (53,7)	177 (49,9)	1,16 ^b	0,68-2,00 ^b	0,584 ^b
	3 (Val/Val)	59 (32,8)	44 (25,1)	103 (29,0)	0,77 ^c	0,42-1,39 ^c	0,382 ^c
	4 (2+3)	142 (78,9)	138 (78,9)	280 (78,9)	1,00 ^d	0,60-1,66 ^d	0,994 ^d
	N	180	175	355			
	qVal	0,56	0,52				
SOD3	1 (Arg/Arg)	177 (98,3)	171 (97,7)	348 (98)	1,00 ^a		
	2 (Arg/Gly)	3 (1,7)	4 (2,3)	7 (2)	1,38 ^b	0,30-6,26 ^b	0,676 ^b
	N	180	175	355			
	qGly	0,01	0,01				
NQO2	1 (Phe/Phe)	88 (58,7)	109 (62,3)	197 (60,6)	1,00 ^a		
	2 (Phe/Leu)	60 (40)	62 (35,4)	122 (37,5)	0,83 ^b	0,53-1,31 ^b	0,433 ^b
	3 (Leu/Leu)	2 (1,3)	4 (2,3)	6 (1,8)	1,62 ^c	0,29-9,02 ^c	0,585 ^c
	4 (2+3)	62 (41,3)	66 (37,7)	128 (39,4)	0,86 ^d	0,55-1,34 ^d	0,506 ^d
	N	150	175	325			
	qLeu	0,21	0,20				
NQO1³⁾	1 (Pro/Pro)	124 (69,7)	119 (68,8)	243 (69,2)	1,00 ^a		
	2 (Pro/Ser)	49 (27,5)	47 (27,2)	96 (27,4)	1,00 ^b	0,62-1,60 ^b	0,998 ^b
	3 (Ser/Ser)	5 (2,8)	7 (4,0)	12 (3,4)	1,46 ^c	0,45-4,72 ^c	0,529 ^c
	4 (2+3)	54 (30,3)	54 (31,2)	108 (30,8)	1,04 ^d	0,66-1,64 ^d	0,859 ^d
	N	178	173	351			
	qSer	0,17	0,18				

Vysvětlivky: 1 = divoký homozygot; 2 = heterozygot; 3 = variantní homozygot; 4 = 2 nebo 3, tj. nosiči aspoň jedné variantní alely; ¹⁾OR = odhad relativního rizika, 95%CI = konfidenční interval dle Mantel-Haenszel; ²⁾P = oboustranná závislost dle Fisherova exaktního testu nebo Pearson Chi-kvadrát testu; ³⁾NQO1 genotyp stanovil MUDr. D. Vrána; N = velikost souboru; qX = frekvence variantní alely

Kombinace genotypů zkoumaných genů

Posledním krokem bylo zjistit, zda vybrané kombinace genotypů sledovaných genů představují rizikový faktor vzniku nádorového onemocnění pankreatu. Kombinace genotypů byly sestaveny jednak s ohledem na statistickou sílu studie (proto nebyla uvažována kombinace s SOD3) a rovněž aby byla testována kombinace obou genů s předpokládanou normální funkcí proti kombinaci s poškozenou funkcí (tj. alespoň jedna variantní alela v obou kombinovaných genech). Testovány byly tyto kombinace genů: SOD2 + NQO1, SOD2 + NQO2, NQO1 + NQO2.

Ani jedna z výše uvedených kombinací se neukázala být statisticky významným rizikovým faktorem pro vznik nádoru pankreatu (tabulka 10, str. 52).

Tabulka 10: Odhad relativního rizika spojeného s nosičstvím dvougenových kombinací zkoumaných polymorfismů u kontrol a případů

Legenda: **a** = referenční OR pro kombinaci genotypů 1 vs. 1; **b** = hodnoty získané pro kombinace genotypů *1 vs. *5

SOD2 + NQO1³⁾	*1 (1+1)	43 (43)	37 (45,1)	80 (44)	1,00 ^a		
	*5 (2/3 + 2/3)	57 (57)	45 (54,9)	102 (56)	0,92 ^b	0,51-1,65 ^b	0,774 ^b
	N	100	82	182			
SOD2 +NQO2	1* (1+1)	18 (20,9)	24 (31,2)	42 (25,8)	1,00 ^a		
	5* (2/3 + 2/3)	68 (79,1)	53 (68,8)	121 (74,2)	0,59 ^b	0,29-1,19 ^b	0,138 ^b
	N	86	77	163			
NQO1³⁾ +NQO2	1* (1+1)	70 (76,1)	75 (78,1)	145 (77,1)	1,00 ^a		
	5* (2/3 + 2/3)	22 (23,9)	21 (21,9)	43 (22,9)	0,89 ^b	0,45-1,76 ^b	0,740 ^b
	N	92	96	188			

Vysvětlivky: 1 = divoký homozygot; 2 = heterozygot; 3 = variantní homozygot; *1 = 1 v obou genech; *5 = 2 nebo 3, tj. nosiči alespoň jedné variantní alely; ¹⁾OR = odhad relativního rizika, 95%CI = konfidenční interval dle Mantel-Haenszel; ²⁾P = oboustranná významnost dle Fisherova exaktního testu nebo Pearson Chi-Square testu; ³⁾NQO1 genotyp stanovil MUDr. D. Vrána; N = velikost souboru

5.2. STUDIE ZAMĚŠTNANCŮ EXPONOVANÝCH A NEEPONOVANÝCH STYRENU

5.2.1. Biomarkery expozice, účinku styrenu a faktory životního stylu

Kromě genotypování enzymů metabolizujících styren, které bylo provedeno v rámci této práce, byly o studované populaci k dispozici následující údaje.

Délka pracovního poměru (DPP) exponované skupiny zaměstnanců byla v průměru $3,88 \pm 4,15$ let. Sledovaná skupina byla na pracovišti vystavena průměrné koncentraci $81,27 \pm 56,34$ mg/m³ (S_{vzduch} , $2,10$ mg/m³ = 1 ppm) styrenu ve vzduchu. Jako indikátor vnitřní expozice byla měřena koncentrace styrenu v krvi (S_{kev}), která v průměru dosahovala hodnoty $0,56 \pm 0,43$ mg/l. Dále byly sledovány metabolity styrenu v moči: kyselina mandlová (MA), kyselina fenylglyoxalová PGA, konjugáty 4-vinylfenolu (VP-GS) a diastereomery fenylhydroxyethyl merkapturové kyseliny PHEMA (M1RR, M1RS, M2T), které byly sledovány pouze u exponované populace. Všechny sledované parametry byly ve větší míře zastoupeny u exponované populace (tabulka 11, str. 53).

Tabulka 11: Charakteristika expozičních parametrů styrenu

	0,00 ± 0,00	81,27 ± 56,34	mg/m ³
	0,07 ± 0,06	0,56 ± 0,43	mg/l
	20,29 ± 7,55	275,35 ± 45,23	mg/g kreatinu
	21,93 ± 8,08	220,56 ± 172,02	mg/g kreatinu
	42,29 ± 15,49	495,86 ± 402,20	mg/g kreatinu
	0,24 ± 0,19	3,85 ± 3,25	mg/g kreatinu
	0,15 ± 0,20	1,80 ± 1,83	mg/g kreatinu
	0,39 ± 0,39	5,64 ± 4,82	mg/g kreatinu
	NA	1670,57 ± 3986,88	mg/g kreatinu
	NA	58,70 ± 153,11	mg/g kreatinu
	NA	1351,12 ± 3205,01	mg/g kreatinu

Vysvětlivky: NA = neanalyzováno; SD = standardní odchylka; S_{vzduch} = koncentrace styrenu ve vzduchu; S_{krv} = koncentrace styrenu v krvi; MA = kyselina mandlová; PGA = kyselina fenylglyoxalová; VP-G = glukuronid vinylfenolu; VP-S = sulfát vinylfenolu; VP-GS = VP-G + VPS = celkové množství konjugátů VP; PHEMA(M1RR,M1RS,M2T) = diastereomery fenylhydroxyethyl merkapturové kyseliny

Dalšími sledovanými parametry (tabulka 12) byly biomarkery genotoxického působení styrenu: jednořetězcové zlomy (SSB), jednořetězcové zlomy vyvolané endonukleázou III (SSB_{endo}), reparační kapacita (RCGy, RCOHG), chromosomové aberace (CTA, CSA, CA_{total}), dvoujaderné buňky s mikrojádry (BN+MN) a hemoglobinové adukty (Hb_{ad}).

Mezi parametry, jejichž vyšší hodnoty byly zastoupeny u exponovaných jedinců patří pouze RCGy, RCOHG, CTA a Hb_{ad}.

Tabulka 12: Charakteristika genotoxických biomarkerů styrenu

	42,52 ± 8,08	40,52 ± 9,29	%
	0,54 ± 0,26	0,29 ± 0,21	SSB/10 ⁹ Da
	0,15 ± 0,33	0,12 ± 0,14	SSB/10 ⁹ Da
	0,64 ± 0,54	1,08 ± 0,47	SSB/10 ⁹ Da
	0,73 ± 0,48	1,17 ± 1,04	SSB/10 ⁹ Da
	3,44 ± 2,30	2,88 ± 2,02	%
	1,51 ± 1,43	1,59 ± 1,34	%
	1,92 ± 1,77	1,29 ± 1,60	%
	2,47 ± 2,14	4,90 ± 2,60	pmol/g globulinu

Vysvětlivky: BN+MN = dvoujaderné buňky s mikrojádry; SSB = jednořetězcové zlomy DNA; SSB_{endo} = jednořetězcové zlomy vyvolané endonukleázou III; RCGy = reparační kapacita SSB po ozáření 5 Gy; RCOHG = reparační kapacita SSB vyvolaných 8-oxoguaninovými adukty; CA_{total} = celkový počet chromosomálních aberací; CTA = chromatidový typ CA; CSA = chromosomový typ CA; Hb_{ad} = hemoglobinové adukty; SD = standardní odchylka

Poslední sledované parametry věk, pohlaví a kouření byly již zhodnoceny v tabulce 7 str. 35.

Údaje o hladině expozice, hodnotách biomarkerů expozice (metabolity styrenu), účinku a faktorů životního stylu pro exponované jedince byly nejprve podrobeny statistické analýze (Spearmanův test), která nám poskytla informace o vzájemných vztazích veličin v podobě korelačního koeficientu **R** a oboustranné významnosti (**P**). Korelační koeficient je mírou intenzity vzájemného vztahu resp. závislosti, jejíž hodnota nabývá hodnot od -1 (zcela nepřímá závislost) až 1 (zcela přímá závislost). Hodnota $R = 0$ vypovídá o tom, že mezi znaky není žádná statisticky zjištělá závislost a hodnota $R = 1$ je ideální hodnotou lineární závislosti.

Závislosti mezi biomarkery expozice

Všechny parametry expozice (S_{vzduch} , S_{krev}) s biomarkery expozice styrenu (**MA**, **PGA**, **VP-G**, **VP-S**, **PHEMA**) navzájem významně korelovaly, což potvrzuje, že analýzy byly provedeny velmi kvalitně a výsledky jsou použitelné pro sledování složitějších vztahů, které byly cílem této práce. Všechny metabolity korelovaly s expozicí i mezi sebou navzájem (tabulka 13, str. 55).

Závislosti mezi biomarkery expozice a účinku styrenu

Z důvodu přehlednosti jsou dále uvedeny pouze významné korelace, ostatní výsledky jsou shrnuty v příloze (tabulky P7 a P8 str. 75-76).

Pro **BN+MN**, **SSB**, **SSB_{endo}**, **RCGy** a **CA** nebyly nalezeny žádné významné korelace s expozičními markery. Pro **SSB_{endo}** nebyla v rámci celé práce získána korelace ani s jiným ze sledovaných parametrů.

RCOHG slabě korelovala s expozicí (S_{vzduch} , S_{krev} , $P > 0,050$) a významně s hlavními metabolity styrenu (**MA** a **PGA**) a také s markerem genotoxického působení **MN**. Vyšší expozice styrenu, množství metabolitů a **MN** byly spojeny s vyšší **RCOHG**. Vyšší **RCOHG** také korelovala s nižším výskytem **SSB**.

Hb_{ad} významně korelovaly s hlavními metabolity styrenu (**MA** a **PGA**) a s markerem genotoxicity **SSB**. Vyšší výskyt **Hb_{ad}** je spojen s vyššími hodnotami metabolitů a s menším množstvím **SSB**.

Tabulka 13: Nalezené závislosti biomarkerů expozice u exponované populace

Legenda: R = 0, parametry nezávislé; R = 1, zcela přímá závislost; R > 0, přímá závislost; P < 0,050, statisticky významné závislosti; zhodnoceno Spearmanovým testem

S _{vzduch}	R		0,822	0,642	0,567	0,633	0,624	0,596	0,638	0,378	0,374	0,529
	P											
	N		72	70	70	70	70	70	70	69	69	69
S _{krv}	R			0,638	0,589	0,635	0,607	0,544	0,602	0,342	0,409	0,503
	P											
	N			75	75	75	75	75	75	74	74	74
MA	R				0,919	0,981	0,869	0,843	0,896	0,570	0,511	0,662
	P											
	N				80	80	80	80	80	75	75	75
PGA	R					0,973	0,759	0,727	0,778	0,479	0,443	0,559
	P											
	N					80	80	80	80	75	75	75
VP-G	R						0,835	0,805	0,859	0,528	0,495	0,621
	P											
	N						80	80	80	75	75	75
VP-S	R							0,834	0,979	0,463	0,406	0,577
	P											
	N							80	80	75	75	75
VP-GS	R								0,918	0,557	0,336	0,681
	P											
	N								80	75	75	75
PHEMA(M1RR,M1RS,M2T)	R									0,509	0,397	0,637
	P											
	N									75	75	75
S _{vzduch} + S _{krv}	R										0,557	0,866
	P											
	N										77	77
S _{vzduch} + MA	R											0,513
	P											
	N											77
S _{vzduch} + PGA	R											
	P											
	N											

Vysvětlivky: St.p. = statistické parametry, R = korelační koeficient, P = oboustranná významnost, N = velikost souboru; S_{vzduch} = koncentrace styrenu ve vzduchu; S_{krv} = koncentrace styrenu v krvi; MA = kyselina mandlová; PGA = kyselina fenylglyoxalová; VP-G = glukuronid vinylfenolu; VP-S = sulfát vinylfenolu; VP-GS = VP-G + VPS = celkové množství konjugátů VP; PHEMA(M1RR,M1RS,M2T) = diastereomery fenylhydroxyethyl merkapturové kyseliny

Závislosti faktorů životního stylu

Věk: Vyšší expozici styrenu byli vystaveni mladší zaměstnanci, u kterých byla sledována i vyšší koncentrace styrenu v krvi. Dalším nalezeným vztahem byla závislost věku na množství konjugátů vinylfenolu (VP-GS). Se zvyšujícím se věkem klesalo množství konjugátů v moči. Mezi genotoxické biomarkery, jejichž vyšší výskyt byl spojen s vyšším věkem, patří MN, celkový výskyt CA a to především chromosomového typu CSA (tabulka 14).

Tabulka 14: Nalezené věkové závislosti

Legenda: $R > 0$ -přímá závislost; $R < 0$ -nepřímá závislost; $P < 0,050$ -statisticky významné závislosti

Parametr	R	P	N
S_{vzduch}	-0,257	0,028	73
S_{krv}	-0,255	0,024	78
MA	-0,222	0,048	80
VP-G	-0,221	0,049	80
VP-S	-0,217	0,053	80
VP-GS	0,332	0,003	79
MN	0,329	0,002	83
CSA	0,371	0,001	83

Vysvětlivky: R = korelační koeficient, P = oboustranná významnost, N = velikost souboru; S_{vzduch} = koncentrace styrenu ve vzduchu; S_{krv} = koncentrace styrenu v krvi; MA = kyselina mandlová; VP-G = glukuronid vinylfenolu; VP-S = sulfát vinylfenolu; VP-GS = VP-G + VPS = celkové množství konjugátů VP; MN = mikrojádra; CA_{total} = celkový počet chromosomálních aberací; CSA = chromosomový typ CA

Délka pracovního poměru (DPP): Vypočtené hodnoty vypovídají o nepřímé závislosti DPP s expozicí a metabolity styrenu (tabulka 15). U jedinců zaměstnaných po delší dobu byly nalezeny nižší koncentrace styrenu ve vzduchu, v krvi i hladiny téměř všech metabolitů styrenu (kromě PHEMA). U jedinců zaměstnaných delší dobu byla také nalezena nižší RCOHG.

Tabulka 15: Nalezené závislosti délky pracovního poměru

Legenda: $R > 0$, přímá závislost; $R < 0$, nepřímá závislost; $P < 0,050$ -statisticky významné závislosti

Parametr	R	P	N
S_{vzduch}	-0,448	0,000	70
S_{krv}	-0,331	0,005	72
MA	-0,302	0,009	74
VP-G	-0,280	0,016	74
VP-S	-0,295	0,011	74
VP-GS	-0,291	0,012	74
MN	-0,341	0,003	74
CA _{total}	-0,302	0,009	74
CSA	-0,290	0,045	48

Vysvětlivky: R = korelační koeficient; P = oboustranná významnost; N = velikost souboru; S_{vzduch} = koncentrace styrenu ve vzduchu; S_{krv} = koncentrace styrenu v krvi; MA = kyselina mandlová; PGA = kyselina fenylglyoxalová; VP-G = glukuronid vinylfenolu; VP-S = sulfát vinylfenolu; VP-GS = VP-G + VPS = celkové množství konjugátů VP; RCOHG = reparační kapacita SSB vyvolaných 8-oxoguaninovými adukty

Kouření: Žádný ze sledovaných parametrů nebyl ovlivněn počtem vykouřených cigaret.

5.2.2. Polymorfismy sledovaných genů

Po statistickém rozdělení genotypů pro skupiny neexponovaných (kontrol) a exponovaných zaměstnanců, byly pro sledované geny vypočteny frekvence variantních alel. Pro EPHX1 byla navíc odhadnuta její celková aktivita (tabulka 8 str.45). Získané výsledky, které jsou shrnuty v tabulce 17 na str. 58, byly dále využity ke studiu vztahu individuální vnímavosti a genotoxicity.

Ke srovnání jsou uvedeny dříve publikované frekvence genotypů a variantních alel u většího souboru kontrolní české populace [Šarmanová a spol., 2000 a 2004].

Závislosti mezi polymorfismy enzymů a genotoxickými biomarkery styrenu

Dalším krokem bylo hledat vztahy mezi polymorfismy biotransformačních enzymů a vnímavostí vůči genotoxickému poškození biologických makromolekul. Vztahy mezi genotypy a biomarkery poškození byly u skupiny pracovníků exponovaných styrenu zhodnoceny prostřednictvím neparametrických statistických testů (Kruskal-Wallis a Mann-Whitney test).

Z důvodu přehlednosti jsou uvedeny pouze významné korelace, ostatní výsledky jsou shrnuty v příloze (tabulky P9 – P23 str. 77-81).

EPHX1-exon 3

U EPHX1-exon 3 byl nalezen významný vztah k RCOHG (tabulka 16). Nositelé alespoň jedné variantní alely (tj. buď variantního nebo heterozygotního genotypu) měli významně nižší hodnoty reparační kapacity oproti nositelům divokého genotypu (P = 0,021).

Tabulka 16: Nalezené závislosti mezi genotypy *EPHX1-exon 3* a markery genotoxicity styrenu

Legenda: *nalezená závislost pro kombinaci genotypů divoký homozygot vs. heterozygot + variantní homozygot, statisticky zhodnoceno Mann-Whitney testem

Genotyp	RCOHG	MA	PGA	P
1	1,31 ± 1,10	0,80 ± 0,65	0,93 ± 0,58	P = 0,021

Vysvětlivky: 1 = divoký homozygot; 2 = heterozygot; 3 = variantní homozygot; SD = standardní odchylka; P = oboustranná významnost; RCOHG = reparační kapacita SSB vyvolaných 8-oxoguaninovými adukty

Tabulka 17: Rozdělení genotypů a frekvence variantních alel biotransformačních enzymů

Legenda: *hodnoty kontrolní české populace publikované Šarmanová a spol., 2000 a 2004

EPHX1 exon 3	1 (Tyr/Tyr)	10 (37)	39 (54,9)	165 (41,5)
	2 (Tyr/His)	11 (40,7)	26 (36,6)	163 (41,0)
	3 (His/His)	6 (22,2)	6 (8,5)	70 (17,5)
	N	27	71	398
	qHis	0,43	0,27	0,38
EPHX1 exon 4	1 (His/His)	28 (82,4)	45 (62,5)	265 (65,6)
	2 (His/Arg)	3 (8,8)	22 (30,6)	118 (29,2)
	3 (Arg/Arg)	3 (8,8)	5 (6,9)	21 (5,2)
	N	34	72	404
	qArg	0,13	0,22	0,20
EPHX1 AKTIVITA	nizká	16 (59,3)	20 (28,2)	162 (43,0)
	střední	10 (37)	39 (54,9)	169 (44,0)
	vysoká	1 (3,7)	12 (16,9)	50 (13,0)
	N	27	71	381
GSTM1	plus	16 (53,3)	30 (42,9)	199 (48,9)
	null	14 (46,7)	40 (57,1)	208 (51,1)
	N	30	70	407
	qnull	0,47	0,57	0,51
GSTT1	plus	23 (88,5)	56 (83,6)	342 (83,6)
	null	3 (11,5)	11 (16,4)	67 (16,4)
	N	26	67	409
	qnull	0,12	0,16	0,16
GSTP1	1 (Ile/Ile)	10 (47,6)	19 (30,2)	203 (50,0)
	2 (Ile/Val)	7 (33,3)	38 (60,3)	162 (39,9)
	3 (Val/Val)	4 (19)	6 (9,5)	41 (10,1)
	N	21	63	406
	qVal	0,36	0,40	0,30

Vysvětlivky: 1 = divoký homozygot; 2 = heterozygot; 3 = variantní homozygot; plus = přítomnost genu; null = delece genu; N = velikost souboru, qX = frekvence variantní alely

EPHX1-exon 4

Pro *EPHX1-exon 4* byla mezi genotypy u obou testů (Kruskal-Wallis i Mann-Whitney) nalezena korelace s genotoxicitou (SSB a MN) a Hb_{ad} (tabulka 18, str. 59). Významně vyšší množství MN (P = 0,004) a Hb_{ad} (P = 0,002) bylo zjištěno u divokých homozygotů ve srovnání s heterozygoty a variantními homozygoty. Naopak množství SSB bylo u divokých homozygotů ve srovnání s nositeli alespoň jedné variantní alely významně nižší (P = 0,002).

Tabulka 18: Nalezené závislosti mezi genotypy *EPHX1-exon 4* a markery genotoxicity styrenu

Legenda: *Kruskal-Wallis test - významná závislost pro kombinaci genotyp 1 vs. genotyp 2 vs. genotyp 3; **Mann-Whitney test - významná závislost pro kombinaci genotyp 1 vs genotyp 2 + genotyp 3

Genotyp	Genotyp 1	Genotyp 2	Genotyp 3	P	P
MN	16,21 ± 6,92	12,74 ± 5,31	10,69 ± 3,82	P = 0,017	P = 0,004
SSB	0,37 ± 0,27	0,45 ± 0,23	0,40 ± 0,24	P = 0,006	P = 0,002
Hb _{ad}	4,26 ± 3,04	3,40 ± 2,10	3,94 ± 2,86	P = 0,036	P = 0,010

Vysvětlivky: MN = mikrojádra; SSB = jednořetězcové zlomy DNA; Hb_{ad} = hemoglobinové adukty; SD = standardní odchylka; P = oboustranná významnost

EPHX1 – aktivita

Mann-Whitney test ukázal významně nižší hladiny SSB u jedinců se střední aktivitou EPHX1 oproti jedincům s vysokou aktivitou (P = 0,036). Hodnoty SSB pro jednotlivé aktivity EPHX1 jsou uvedeny v tabulce 19.

Tabulka 19: Nalezené závislosti mezi aktivitou EPHX1 a markery genotoxicity styrenu

Legenda: *P - významná závislost pro kombinaci aktivit střední vs. vysoká; statisticky zhodnoceno Mann-Whitney testem

Genotyp	Genotyp 1	Genotyp 2	Genotyp 3	P
SSB	0,49 ± 0,31	0,25 ± 0,14	0,46 ± 0,28	P = 0,036

Vysvětlivky: SSB = jednořetězcové zlomy DNA; SD = standardní odchylka; P = oboustranná významnost

GSTM1

Byla nalezena velmi významná korelace delece *GSTM1* s hladinami všech PHEMA diastereomerů v moči exponovaných dělníků a s CTA typem CA. Jedinci s delecí genu *GSTM1* měli významně nižší hladiny těchto metabolitů i CTA oproti jedincům s funkčním genem (tabulka 20).

Tabulka 20: Nalezené závislosti mezi delecí *GSTM1* a markery expozice a genotoxicity styrenu

Legenda: statisticky zhodnoceno Mann-Whitney testem; P- významná závislost pro genotyp 1 vs. genotyp 3

Genotyp	Genotyp 1	Genotyp 2	P
MN	4028,71 ± 5867,32	374,31 ± 981,11	P = 0,000
SSB	137,54 ± 233,90	12,31 ± 21,93	P = 0,000
Hb _{ad}	2927,68 ± 4882,56	555,71 ± 867,26	P = 0,001
CTA	1,87 ± 1,27	1,40 ± 1,39	P = 0,042

Vysvětlivky: 1 = *GSTM1-plus*;; přítomnost genu; 3 = *GSTM1-null*, delece genu; **SD** = standardní odchylka; **P** = oboustranná významnost; **PHEMA M1RR,M1RR,M2T** = diastereomery fenyhydroxyethyl merkapturové kyseliny; **CTA** = chromatidový typ chromosomálních aberací

GSTT1

Mezi sledovanými biomarkery expozice a genotoxicity nebyl nalezen v souvislosti s delecí genu *GSTT1* žádný statisticky významný vztah. Na hranici významnosti byla získána korelace delece *GSTT1* s vyšší hladinou Hb_{ad} (P = 0,057).

GSTP1

Oba neparametrické statistické testy naznačily korelaci polymorfismu *GSTP1* s metabolity PGA, PHEMA M1RR, PHEMA M2T a závislost na hranici významnosti k MA. Nalezené vztahy byly sledovány mezi variantními a divokými homozygoty. U prvních zmíněných byly pozorovány výrazně nižší hodnoty těchto metabolit (tabulka 21). Korelace s biomarkery genotoxicity nalezena nebyla.

Tabulka 21: Nalezené závislosti mezi genotypy *GSTP1* a markery genotoxicity styrenu

Legenda: * Kruskal-Wallis - významná závislost pro genotyp 1 vs. genotyp 2 vs. genotyp 3; ** Mann-Whitney - významná závislost pro kombinaci genotypů 1 vs. 3

	331,10 ± 340,68	307,54 ± 231,90	73,86 ± 45,42	P = 0,018	P = 0,056
	258,10 ± 208,22	244,08 ± 164,88	78,29 ± 45,17	P = 0,021	P = 0,033
	589,20 ± 505,56	551,49 ± 368,37	152,43 ± 90,16	P = 0,018	P = 0,044
	1860,76 ± 3146,56	2634,46 ± 5313,17	42,50 ± 17,52	P = 0,006	P = 0,020
	1393,35 ± 1872,65	2163,80 ± 4427,13	97,83 ± 78,06	P = 0,013	P = 0,010

Vysvětlivky: 1 = divoký homozygot; 2 = heterozygot; 3 = variantní homozygot; **SD** = standardní odchylka; **P** = oboustranná významnost; **MA** = kyselina mandlová; **PGA** = kyselina fenyglyoxalová; **PHEMA M1RR, M2T** = diastereomery fenyhydroxyethyl merkapturové kyseliny

6. DISKUZE

6.1. STUDIE PŘÍPADŮ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ PANKREATU A KONTROLNÍ SKUPINY

Karcinom pankreatu patří k onemocněním s rychlým a fatálním průběhem, jehož incidence stále stoupá. V České republice došlo za posledních 50 let k více než trojnásobnému zvýšení incidence tohoto onemocnění. O závažnosti karcinomu pankreatu vypovídá nejen fakt, že úmrtnost je prakticky shodná s incidencí, ale i medián přežívání, který se pohybuje pouze okolo 3–6 měsíců [Kollarova a spol., 2007]. Při použití ukazatele světové standardizované incidence na 100 000 obyvatel v ČR dosahuje u mužů hodnot 17,6 a u žen 7,1 [ÚZIS, 2003].

Výsledky statistické analýzy potvrdily publikovaný fakt, že toto onemocnění je rozšířeno u lidí staršího věku. Průměrný věk pacientů v této studii byl 62 let. V souladu s literaturou byla i skutečnost, že námi sledovaná skupina pacientů byla tvořena více muži - 62%.

Jako možný rizikový faktor vzniku karcinomu pankreatu byl sledován polymorfismus některých antioxidantních enzymů (SOD2, SOD3, NQO1, NQO2) chránící buňku před poškozením biologických molekul oxidačním stresem, které je spojováno s celou řadou onemocnění včetně nádorového.

Prvním sledovaným enzymem byl mitochondriální antioxidant superoxiddismutáza 2 (SOD2). Studium jeho polymorfismu (Ala16Val) v souvislosti s nádorovým onemocněním je opodstatněné, neboť převládá názor, že lokalizace sledovaného polymorfismu narušuje helikální strukturu části proteinu zajišťujícího transport enzymu do mitochondrií. Tímto je snížena ochrana buňky před poškozením a je předpokládáno úzké spojení tohoto polymorfismu s karcinogenezi [Rosenblum a spol., 1996; Shimoda-Matsubayashi a spol., 1996; Hung a spol., 2004]. V některých studiích byla uvedena významná závislost množství *SOD2* na rychlosti proliferace nádorových buněk pankreatu a bylo navrženo využití vynucené exprese *SOD2* jako nástroje k potlačení maligního fenotypu [Weydert a spol., 2003; Cullen a spol., 2003].

Na rozdíl od *SOD2* není případný biologický význam polymorfismu superoxiddismutázy 3 (*SOD3*) v karcinogenezi znám, je tedy atraktivním cílem pro budoucí objasnění antioxidantních mechanismů, kterými je organizmus vybaven. *SOD3* zajišťuje stejně jako *SOD2* vychytávání O_2^- , ale v extracelulárním prostoru. Přítomnost polymorfismu (Arg231Gly) má za následek snížení afinity proteinu k buněčnému povrchu a vede ke zvýšení enzymu v plazmě neboli snížení antioxidantní ochrany na površích [Campo a spol., 2005].

NAD(P)H: chinonoxidoreduktáza 1 (NQO1) je jedním z dobře prozkoumaných enzymů, předcházející oxidačnímu poškození redukcí reaktivních chinonů na hydrochinony. Polymorfismus (Pro187Ser) v obou alelách představuje úplnou ztrátu aktivity NQO1, proto je velmi vhodným

cílem pro studium závislosti mezi oxidačním stresem a rizikem rozvoje nádorového onemocnění pankreatu. Na druhé straně, z literárních zdrojů není stále plně objasněno, jakou roli v organizmu hraje enzym NQO2 a jeho polymorfismus (Phe47Leu). Díky své vysoké homologii s NQO1 je však vhodným předmětem studia.

Na rozdíl od *NQO1*, jejíž úloha v rozvoji nádorů byla již několikrát publikována [např.: u nádorů prsu viz. Šarmanová a spol., 2004], sledovaný polymorfismus *SOD3* ani *NQO2* dosud nebyl u nádorů pankreatu ani u jiných nádorů studován.

Superoxiddismutáza 2 (SOD2)

Statistická analýza neukázala mezi skupinami pacientů a kontrol významný rozdíl v rozdělení genotypů *SOD2* (Ala16Val), což je v rozporu s výsledky studie Wheatley-Price a spol. (2008), která také porovnávala distribuci tohoto polymorfismu u pacientů s karcinomem pankreatu (122 jedinců) a kontrolní skupiny tvořené (331 jedinců). Jedná se dosud o jedinou publikovanou studii na toto téma, která našla významně více variantních homozygotů (Val/Val) ve skupině pacientů ve srovnání s kontrolní skupinou a vyjádřila riziko spojené s nosičstvím variantního genotypu oproti divokému (Ala/Ala) jako téměř dvojnásobné ($P = 0,050$). V rámci naší studie nebylo toto riziko potvrzeno ($P = 0,380$).

Stejně jako v případě *SOD2* neprokázala statistická analýza významný rozdíl v zastoupení jednotlivých genotypů a frekvencí variantních alel mezi pacienty a kontrolami ani u dalších sledovaných enzymů *SOD3*, *NQO1* či *NQO2*.

Superoxiddismutáza 3 (SOD3)

U nádorů pankreatu dosud polymorfismus *SOD3* nebyl studován. Jediná známá studie nenalezla závislost polymorfismu v *SOD3* ke vzniku nádorů prostaty [Kang a spol., 2007]. V rozsáhlé studii 1200 zdravých jedinců jihoevropské populace nebyl nalezen ani jeden jedinec s variantní alelou *SOD3* (Arg213Gly) [Campo a spol., 2005]. V kontrolní skupině této studie byli identifikováni pouze tři heterozygoti a ve skupině pacientů čtyři, což vypovídá o velmi ojedinělém výskytu této varianty. Frekvence variantní alely byla u pacientů a kontrol srovnatelná $q_{Gly} = 0,01$. Získaná frekvence byla v rozmezí hodnot uváděných v genové databázi jednonukleotidových polymorfismů pro evropskou populaci 0 – 0,033 % [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>].

NRH: chinonoxidoreduktáza 2 (NQO2)

Polymorfismus vyskytující se v *NQO2* patří rovněž mezi málo probádané. Frekvence variantní alely $q_{Leu}=0,16$ byla pozorována u případů karcinomu ovarií a močového měchýře [Jamieson a spol., 2007].

Zatím nepublikované výsledky na kontrolní skupině české populace (322 jedinců) ukazují na frekvenci qLeu = 0,23 [Hubáčková], která je blízká hodnotám nalezeným v této studii u kontrolní skupiny (qLeu = 0,21) i u pacientů (qLeu = 0,20). Tyto hodnoty jsou blízké i hodnotám uváděným v genové databázi qLeu = 0,25 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>].

NAD(P)H: chinonoxidoreduktáza (NQO1)

Ani u posledního sledovaného genu *NQO1* se frekvence variantní alely u kontrolní skupiny (qSer = 0,17) a pacientů (qSer = 0,18) významně nelišily. Hodnoty byly blízké výsledkům diplomové práce provedené na české populaci o velikosti 436 zdravých jedinců (qSer = 0,18) [Grosová, 2006] i výsledkům jiného souboru 313 jedinců kontrolní české populace (qSer = 0,15) [Šarmanová a spol. 2004]. V další studii kavkazské populace byla u kontrolní skupiny získána vyšší frekvence variantní alely qSer= 0,21 [Hung a spol., 2004]

Posledním cílem studia byla analýza kombinací genotypů různých enzymů nesoucích variantní alelu vs. jejich divoké formy *SOD2+NQO1*, *SOD2+NQO2* a *NQO1+NQO2*. S ohledem na statistickou sílu studie nebyly kombinace s málo četným polymorfismem *SOD3* sledovány.

Ani jedna z těchto kombinací neukázala významný vztah k riziku nádorového onemocnění pankreatu. Literární údaje pro sledované kombinace nejsou k dispozici, a tudíž je tato studie unikátní.

V rámci práce tedy nebyla nalezena závislost alelické frekvence sledovaných enzymů k riziku vzniku nádorového onemocnění pankreatu. Výsledky studie bude třeba ověřit na větších skupinách pacientů a kontrol s ohledem na údaje o kouření, které nebyly v době prvního hodnocení výsledků k dispozici (náběr dat trvá). Kouření může být také jedním z přispívajících faktorů vedoucích k rozporným výsledkům, neboť je jedním z nezávislých rizikových faktorů karcinomu pankreatu.

6.2. STUDIE ZAMĚSTNANCŮ EXPONOVANÝCH A NEEXPONOVANÝCH STYRENU

Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny IARC klasifikovala styren jako možný lidský karcinogen skupiny 2B [IARC 1994 a 2002] a jeho hlavní intermediát styren-7,8-oxid jako pravděpodobný lidský karcinogen skupiny 2A [IARC 1994].

K objasnění mechanismu genotoxického a případně i karcinogenního působení styrenu na lidský organizmus je nezbytné zjistit, jakou roli v tomto procesu hraje individuální vnímavost jedince respektive polymorfismy biotransformačních enzymů metabolizujících styren mající vliv na jeho účinky.

V této práci byly sledovány závislosti mezi biomarkery vnější i vnitřní expozice, genotoxického účinku a polymorfismy enzymů metabolizujících styren. Jako možné modifikátory byly sledovány i faktory jako jsou věk, pohlaví a kouření tabáku.

Metabolismus styrenu začíná jeho oxidací na styren oxid (SO), která je zprostředkovávaná cytochromy P450 (CYP). SO je dále detoxikován epoxidhydrolázou 1 (EPHX1) především na terminální metabolity kyselinu mandlovou (MA) a kyselinu fenylglyoxalovou (PGA). Minoritní cesty detoxikace styrenu spočívají v konjugaci SO s glutathionem za vzniku kyseliny fenylhydroxyethyl merkapturové (PHEMA) nebo konjugátů vinylfenolu (VP-G, VP-S).

Analýza metabolitů styrenu potvrdila, že byly nalezeny metabolity všech výše popsaných cest odbourávání styrenu, a tudíž vybrané geny byly relevantní a vliv expozice prokázán.

POLYMORFISMY A BIOMARKERY EXPOZICE

Velmi významná korelace, která byla nalezena mezi všemi parametry expozice (S_{vzduch} , S_{krv}) a metabolity styrenu (MA, PGA, VP-G, VP-S, PHEMA) navzájem ($P \leq 0,002$), potvrdila, že analýzy byly provedeny velmi kvalitně a výsledky byly vhodné pro sledování úlohy genetické variability enzymů metabolismu styrenu. Podobné závislosti mezi markery vnější i vnitřní expozice a metabolity styrenu v moči byly publikovány ve studii Vodicka a spol., 2004.

Skupina zaměstnanců laminárny byla na pracovišti vystavena průměrné koncentraci $81,27 \pm 56,34 \text{ mg/m}^3$ (cca 39 ppm) styrenu v ovzduší (S_{vzduch}). Tato hodnota představovala téměř 5-krát nižší hodnotu než je přípustný expoziční limit (PEL) v České republice 400 mg/m^3 . U kontrolní skupiny nebyl styren ve vzduchu naměřen. Jako indikátor vnitřní expozice byla sledována koncentrace styrenu v krvi (S_{krv}), která byla u exponované skupiny v průměru $0,56 \pm 0,43 \text{ mg/l}$, ale v malé míře byla naměřena i v krvi neexponované (kontrolní) skupiny $0,07 \pm 0,06 \text{ mg/l}$. Přítomnost styrenu v krvi kontrolní skupiny, která byla tvořena také zaměstnanci laminárny (úředníci), lze vysvětlit jejich občasnou expozicí, která také byla potvrzena přítomností téměř všech metabolitů styrenu (kromě PHEMA, které nebyly měřeny) v jejich moči.

Kyselina mandlová (MA) a kyselina fenylglyoxalová (PGA) představují hlavní metabolity styrenu vylučované močí a tvoří cca 90% z celkového množství všech metabolitů [Johanson a spol., 2000]. Jedním z faktorů, který by mohl ovlivňovat množství těchto metabolitů je aktivita hlavního detoxikačního enzymu metabolizujícího styren oxid EPHX1, která je determinovaná kombinací polymorfismů v exonu 3 a 4. Snížená detoxikace styren-7,8-oxidu (SO) na MA a PGA by se také mohla projevit ve zvýšeném množství minoritních terminálních metabolitů jako je PHEMA či VP konjugátů. Ve sledované populaci však žádné korelace mezi polymorfismem *EPHX1* a některým z uvedených metabolitů nalezeny nebyly. Naopak byl nalezen vztah k polymorfismu v *GSTP1*, kdy nositelé variantního genotypu v *GSTP1*, který kóduje enzym s nižší afinitou a stabilitou, měli významně nižší hladiny MA, PGA i PHEMA oproti nositelům divokých alel. Podle názoru Teixeira a spol., 2004 by se oslabení odbourávání styrenu vedlejší cestou mohlo projevit v posílení odbourávání cestou hlavní resp. ve zvýšení MA a PGA. Tato závislost však v naší studii nebyla nalezena a ani pro ostatní *GST* neplatí. Námi nalezený vztah *GSTP1* k hlavním metabolitům styrenu dosud nebyl popsán a vzhledem k tomu, že všechny metabolity korelují stejným směrem, bude předmětem dalšího výzkumu na větších souborech exponovaných jedinců a rovněž i cílem dalších nezávislých studií.

Glukuronid a sulfát vinylfenolu (VP-GS) U skupiny exponovaných zaměstnanců byly naměřeny také metabolity styren-3,4-oxidu (VP-GS), který vedle styren-7,8-oxidu tvoří alternativní minoritní produkt oxidace styrenu. Tyto metabolity byly v řádově nižší koncentraci nalezeny i u neexponovaných zaměstnanců. Příspěvek VP-GS k celkovému genotoxickému působení styrenu však nebyl dosud důkladně prostudován [Manini a spol., 2003]. Naše studie navíc nenalezla vztah VP-GS k žádnému ze sledovaných polymorfismů.

Fenylhydroxyethyl merkapturová kyselina (PHEMA) Konjugace SO s glutathionem reprezentuje další minoritní metabolickou cestu, v níž množství terminálního metabolitu PHEMA představuje méně než 1% metabolitů styrenu [Vodička a spol., 2006]. V moči exponovaných zaměstnanců byly detekovány všechny tři sledované diastereomery PHEMA. V souladu se studiemi De Palma a spol., 2001 a Manini a spol., 2002 byla i v naší studii nalezena velmi významná závislost mezi exkrecí PHEMA a polymorfismem v genu *GSTM1* ($P \leq 0,001$). Jedinci s delecí *GSTM1* vylučovali méně všech diastereomerů, což vypovídá o protektivní roli funkčního enzymu v odstraňování SO z organismu. Ve výše uvedených studiích bylo u jedinců s delecí *GSTM1* nalezeno 5-6-krát méně těchto metabolitů, stejně jako v naší studii pro PHEMA M2T. Diastereomerů M1RR a M1RS bylo nalezeno až 11-krát menší množství ve srovnání s jedinci nesoucími *GSTM1*. Navíc jsme našli již výše diskutovaný dosud nepublikovaný vztah polymorfismu *GSTP1* ke koncentraci PHEMA v moči. Deleční polymorfismus v *GSTM1* se dle námi získaných výsledků významně nepodílí na metabolismu styrenu. Tento závěr je v rozporu s řadou studií, v kterých se tento gen ukázal být důležitým protektivním faktorem při vzniku

genetického poškození [vyšší reparační kapacita, Godderis a spol., 2004], [méně SSB, Buschini a spol., 2003] a nemáme pro něj dosud vysvětlení.

Jedním z faktorů, který se podílel na množství vylučovaných metabolitů styrenu u námi sledované exponované populace, byl také věk. U zaměstnanců starších než je průměrný věk ve studii (37 let), bylo nalezeno menší množství konjugátů vinylfenolu (VP-GS) v moči. Starší lidé tedy díky pomalejší glukuronidaci a sulfataci mohou být vnímavější ke genotoxickému působení styrenu. U starších zaměstnanců bylo v rámci této studie navíc nalezeno významně vyšší poškození DNA, jmenovitě více mikrojader (MN, $P = 0,003$), chromosomálních aberací (CA_{total} , $P = 0,002$) a to především chromosomálního typu (CSA, $P = 0,001$). Je však nutno podotknout, že odbourávání styrenu přes konjugáty vinylfenolu (VP) je považováno za minoritní cestu a nelze tedy její omezení považovat za hlavní zdroj nalezených genetických změn.

POLYMORFISMUS A MARKERY GENOTOXICKÉHO PŮSOBENÍ STYRENU

Jednořetězcové zlomy (SSB) vyvolané endonukleázou III (SSB_{endo}) Vyšší množství SSB bylo naměřeno u kontrolní skupiny ve srovnání s exponovanými jedinci ($0,54 \pm 0,26$ vs. $0,29 \pm 0,21$ SSB/ 10^9 Da). Tento výsledek je v souladu se studií Vodicka a spol., 2004, ale v rozporu s jinými studiemi, ve kterých byl vyšší výskyt SSB nalezen u exponovaných jedinců a koreloval s guaninovými adukty [Vodicka a spol., 1999] či CA [Somorovská a spol., 1999]. Možným vysvětlením je fakt, že studie z roku 1999 byly provedeny na zaměstnancích exponovaných v průměru 14 let, avšak současná studie se zabývá jedinci s průměrnou expozicí kratší než 4 roky. Na druhé straně se zdá, že relativně nízké hodnoty SSB u exponovaných osob byly závislé na účinnější reparační kapacitě (RCOHG), která ve starších studiích nebyla sledována. V naší studii navíc oproti dřívějším pracím nebyla nalezena korelace SSB s expozicí a metabolity styrenu.

Z markerů individuální vnímavosti byl nalezen pouze vztah k polymorfismu *EPHX1-exon 4*. Nosiči alespoň jedné variantní alely měli významně vyšší množství SSB oproti nosičům divokého genotypu ($P = 0,002$). Tento vztah však nebyl potvrzen analýzou aktivity EPHX1 odvozené kombinací obou sledovaných polymorfismů. V této analýze byl zaznamenán kontroverzní výsledek kdy jedinci se střední (normální) aktivitou EPHX1 měli téměř 2-krát nižší hladiny SSB ve srovnání s nosiči alel pro vysokou, ale i nízkou aktivitu. Výsledky Naccarati a spol., 2006, ukazují na vyšší výskyt SSB pouze u jedinců s nízkou aktivitou (ve srovnání s jedinci se střední aktivitou). V naší studii, podobně jako ve studii Naccarati a spol., 2006, nebyla nalezena korelace SSB s expozicí, věkem, pohlavím či kouřením.

Žádná závislost nebyla nalezena ani pro SSB indukované endonukleázou III, což je v souladu se závěry předchozí studie [Naccarati a spol. 2006]. Nebyl pozorován ani rozdíl v rozdělení SSB_{endo} mezi kontrolní a exponovanou skupinou ($0,15 \pm 0,33$ vs. $0,12 \pm 0,14$ SSB/ 10^9 Da). Tento výsledek je v souladu se studií Vodicka a spol., 2004.

Dvoujaderné buňky s mikrojádry (BN+MN) U kontrolní skupiny byla nalezena nepatrně vyšší frekvence výskytu dvoujaderných buněk s mikrojádry BN+MN oproti exponované skupině ($42,52 \pm 8,08$ vs. $40,52 \pm 9,29\%$). Opačný výsledek byl pozorován ve studii Vodicka a spol. (2004), v níž frekvence BN+MN pozitivně korelovala s expozicí a jejími markery i s věkem a více BN+MN bylo nalezeno u žen než u mužů ($P < 0,001$). V naší kontrolní skupině bylo více žen, což mohlo mít na množství BN+MN vliv, protože obecně mají ženy exponované genotoxinům více MN ve srovnání s muži [Kirsch-Volders a spol., 2006]. Pro MN byla rovněž zjištěna významná korelace s věkem [Vodicka a spol., 2004], která díky věkovému rozdílu kontrol a exponovaných lidí mohla ovlivnit i naměřené výsledky v této studii. Vztah BN+MN k markerům vnímavosti (polymorfismům) námi pozorován nebyl.

Chromosomální aberace (CA) Zjištěná frekvence nejdůležitějšího markeru genotoxického působení, CA, byla stejně jako u SSB a SSB_{endo} nevýznamně vyšší u kontrolní skupiny oproti skupině exponované ($3,44 \pm 2,30$ vs. $2,88 \pm 2,02 \%$). Absence efektu expozice styrenu na frekvenci CA byla nalezena i ve studii Vodicka a spol., 2004. Naopak ve studii Somorovská a spol., 1999 vyšší CA u exponovaných pozorovány byly. Je pravděpodobné, že odlišné působení styrenu na CA bylo způsobeno kratší expoziční dobou v naší studii.

Věk jako jediný sledovaný faktor pozitivně koreloval s výskytem CA ($CA_{total} P = 0,002$ a $CSA P = 0,001$). Z tohoto důvodu věkový rozdíl mezi kontrolní a exponovanou skupinou může být dalším vysvětlením vyššího výskytu CA u kontrol.

Vyšší výskyt CA je v řadě studií spojován, kromě expozice, také s nízkou aktivitou EPHX1 [Vodicka a spol., 2001; Musak a spol., 2008], která zprostředkovaná hydrolýzu resp. detoxikaci celé řady xenobiotik včetně styrenu. Ve studii Musak a spol., 2008 byl vyšší výskyt CA pozorován u kuřáků a jedinců s delecí genu *GSTT1* exponovaných butadienu a dalším xenobiotikům v gumárenských závodech. Korelace s věkem však, na rozdíl od naší studie, pozorována nebyla. Jedinci s delecí genu *GSTM1* měli v naší studii nižší úroveň CTA ($P = 0,042$). Tento výsledek je v rozporu s očekávanou detoxikační schopností *GSTM1*. Nicméně již byla nalezena nižší frekvence SSB (prekurzoru CA) u jedinců s delecí *GSTM1* oproti nosičům divokého (funkčního) genotypu [Buschini a spol., 2003]. Nelze ani vyloučit, že vzhledem k poměrně hraniční významnosti se může jednat o efekt mnohonásobného testování a tudíž falešně pozitivní výsledek.

Delece genu *GSTM1* byla v literatuře popsána jako rizikový faktor genotoxického poškození také v kombinaci s nízkou aktivitou EPHX1 [Naccarati a spol., 2006] nebo v kombinaci s delecí *GSTT1* [Bernardini a spol., 2002]. Ve studii Laffon a spol., 2003 bylo zjištěno genotoxické působení SO u jedinců s kombinací variantní alely *GSTP1* s nízkou aktivitou EPHX1. V naší studii nebyla závislost polymorfismů v *GSTT1* či *GSTP1* s markery genotoxicity pozorována.

REPARAČNÍ KAPACITA

Vyšší kapacita opravy SSB po indukci vzniku 8-oxoguaninových aduktů (**RCOHG**) byla nalezena u skupiny exponovaných zaměstnanců ve srovnání s kontrolní skupinou ($1,17 \pm 1,04$ vs. $0,73 \pm 0,48$ SSB/ 10^9 Da). Pozitivní korelace reparační kapacity na hranici významnosti ($P > 0,050$) byla pozorována pro vnější (styren ve vzduchu, S_{vzduch}) i vnitřní expozici (styren v krvi, S_{krv}) styrenu. Významnější závislost byla nalezena s hlavními metabolity MA a PGA ($P = 0,030$). Ve studii Slyskova a spol. (2007) na menším souboru (24 exponovaných a 15 kontrol) nebyla u exponovaných jedinců nalezena významná korelace RCOHG s expozicí (S_{vzduch} , S_{krv}) ani s markery genotoxického působení styrenu – SSB. Ve shodě s naší studií nebyla nalezena ani korelace s CA. Vyšší reparační kapacita ve zmíněné studii byla pozorována pouze u neexponovaných mužů ($P = 0,010$) a neexponovaných kuřáků ($P = 0,037$). Výsledky naší i publikované studie [Vodicka a spol., 2004] jsou v souladu s hypotézou, že kapacita reparace je modulována expozicí.

V rámci této studie byla jediná závislost reparační kapacity na polymorfismu nalezena v *EPHX1-exon 3*. Nosiči alespoň jedné variantní alely (kódující enzym s nižší aktivitou) se vyznačovali významně nižšími hodnotami RCOHG oproti nosičům divokého genotypu ($P = 0,021$). Tento výsledek dosud nebyl publikován, avšak nebyl podpořen výsledky analýz aktivity EPHX1. Je tedy nezbytné jej potvrdit nebo vyvrátit nezávislou studií nebo na větším souboru. Významně vyšší RCOHG byla dříve nalezena u jedinců s přítomností funkčního *GSTM1* ve srovnání s jedinci s delecí tohoto genu ($P = 0,008$), avšak závislost s polymorfismy v *EPHX1* nalezena nebyla [Slyskova a spol., 2007]. Naše studie naopak nenalezla vztah RCOHG k *GSTM1*. Nižší RCOHG byla nalezena také u jedinců zaměstnaných po delší dobu ($P = 0,045$). Tato závislost naznačuje, že jedinci dlouhodobě vystavení expozici styrenu ztrácejí schopnost opravovat poškození DNA. Navíc nižší množství metabolitů MA, PGA, VP-GS u těchto jedinců vypovídá o snížené schopnosti odbourávání styrenu. Oba tyto nalezené vztahy by se mohly projevit ve zvýšeném výskytu některých genotoxických markerů, avšak žádná taková korelace nalezena nebyla.

Schopnost reparace SSB vyvolané γ -zářením (**RCGy**) byla u exponované populace v porovnání s kontrolní skupinou vyšší ($1,08 \pm 0,47$ vs. $0,64 \pm 0,54$ SSB/ 10^9 Da; $P = 0,002$). Žádná souvislost RCGy s polymorfismy genů metabolismu styrenu ani s markery expozice či účinku nebyla nalezena.

HEMOGLOBINOVÉ ADUKTY (Hb_{ad})

Hb_{ad} byly sledovány nejen jako marker vnitřní expozice, ale i jako indikátor schopnosti SO atakovat nukleofilní místa. Na rozdíl od klasických genotoxických markerů bylo více Hb_{ad} zjištěno u exponované skupiny ve srovnání s kontrolní ($4,90 \pm 2,60$ vs. $2,47 \pm 2,14$ pmol/g globinu; $P < 0,001$). Stejný trend byl pozorován v dalších studiích [Teixeira a spol., 2007 a Vodicka a spol., 2003]. V rámci této práce byla nalezena významná korelace Hb_{ad} s hlavními metabolity styrenu v moči (MA a PGA; $P = 0,023$). Tato korelace byla u exponovaných jedinců pozorována také ve studii Teixeira a spol., 2007 ($P < 0,020$), nicméně stejně jako v naší ani v této studii nebyla nalezena korelace Hb_{ad} s expozicí. Naopak korelace Hb_{ad} s vnější i vnitřní expozicí byla nalezena u studie Vodicka a spol., 2003. Nalezená korelace Hb_{ad} s SSB teoreticky může vypovídat o schopnosti SO vytvářet kovalentní vazby s DNA. Vyšší výskyt Hb_{ad} byl v naší studii spojen s menším výskytem SSB ($P = 0,040$). Naopak přímá závislost mezi těmito markery byla nalezena ve studii Godderis a spol., 2004. Tato studie byla zaměřena na vliv genotoxického působení styrenu při nízké expozici (cca 10 ppm), kde nebyl pozorován rozdíl v hladině Hb_{ad} mezi exponovanými a neexponovanými jedinci, ale byla zde získána korelace s expozicí.

Jediným polymorfismem, který (na hranici významnosti) ovlivňoval množství Hb_{ad}, byla delece *GSTT1*. U jedinců s delecí tohoto genu byla sledována vyšší hladina Hb_{ad} oproti jedincům s funkčním genem ($P = 0,057$). Delece v *GSTT1* je často spojována s vyšší hladinou poškození DNA (BN+MN viz. Migliore a spol., 2006; SSB viz. Buschini a spol., 2003; reparační kapacita viz. Godderis a spol., 2004; CA viz. Musak a spol., 2008). Vztah mezi hladinou Hb_{ad} a tímto polymorfismem u lidí exponovaných styrenu dosud publikován nebyl. Otázka vlivu polymorfismů na množství Hb_{ad} a jiných genotoxických markerů je nejčastěji diskutována ve spojení s aktivitou EPHX1. Hypotézy předpokládají, že N-terminální Hb_{ad} vznikají více u jedinců s nízkou aktivitou EPHX1 díky nedostatečné hydrolýze SO vedoucí k jeho akumulaci v organizmu. V souladu s touto hypotézou studie Teixeira a spol., 2007 popsala nález nižšího množství Hb_{ad} u exponovaných jedinců se zvýšenou aktivitou EPHX1. V této studii však byla pozorována pouze závislost mezi Hb_{ad} a polymorfismem *EPHX1* v exonu 4, který aktivitu zvyšuje o 25%, a nikoliv vztah k aktivitě odvozené kombinací polymorfismů v exonech 3 (snížení aktivity o 60%) a 4. Celková aktivita EPHX1 ani jednotlivé polymorfismy v naší práci neměly na množství Hb_{ad} vliv a tudíž nemůžeme výše uvedenou hypotézu potvrdit.

Žádný ze sledovaných biomarkerů expozice a účinku nebyl významně závislý na pohlaví ani na spotřebě tabáku.

Závěrem lze říci, že tato studie ukázala značnou složitost sledovaných vztahů a naznačila, že úloha metabolismu v genotoxicitě styrenu není zdaleka jediným důležitým faktorem. Oprava DNA a buněčná regulace bude rovněž významně přispívat ke dříve zjištěným poznatkům o genotoxicitě styrenu.

7. ZÁVĚR

7.1. STUDIE PŘÍPADŮ NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ PANKREATU A KONTROLNÍ SKUPINY

U většiny vzorků se podařilo stanovit genotypy polymorfních enzymů, jmenovitě: *SOD2* (Ala16Val), *SOD3* (Arg231Gly) a *NQO2* (Phe47Leu). Výsledky genotypování *NQO1* (Pro187Ser) byly pro účely komplexní statistické analýzy laskavě poskytnuty MUDr. Davidem Vránou. V rozdělení jednotlivých genotypů (divoký homozygot, heterozygot, variantní homozygot) ani ve frekvenci variantních alel sledovaných enzymů nebyly nalezeny mezi pacienty a kontrolní skupinou statisticky významné rozdíly ($P < 0,050$).

V analýze rizika nosičství genotypů s variantní alelou (heterozygot, variantní homozygot, heterozygot+variantní homozygot) vůči divokému genotypu (divoký homozygot) nebyl mezi pacienty a kontrolami nalezen žádný statisticky významný vztah ($P < 0,050$) ani u jednoho ze sledovaných genů.

Ani zhodnocením dvougenovým kombinací polymorfismů nebyla nalezena významná závislost.

Závěrem lze tedy konstatovat, že nebyla nalezena žádná významná souvislost mezi polymorfismy *SOD2*, *SOD3*, *NQO2*, *NQO1* a rizikem vzniku nádorového onemocnění pankreatu.

7.2. STUDIE ZAMĚSTNANCŮ EXPONOVANÝCH A NEEXPONOVANÝCH STYRENU

Pro sledované polymorfismy: *EPHX1-exon 3* (Tyr113His), *EPHX1-exon 4* (His139Arg), *GSTM1* (null-delece genu), *GSTT1* (null-delece genu), *GSTP1* (Ile105Val) se u většiny vzorků podařilo stanovit genotypy a určit frekvence variantních alel. Pro *EPHX1* byla odhadnuta na základě kombinací obou polymorfismů celková aktivita enzymu.

Pro polymorfismus *EPHX1-exon 3* byla nalezena významná závislost s reparační kapacitou, kdy nositelé alespoň jedné variantní alely kódující enzym s nižší aktivitou (tj. buď variantního nebo heterozygotního genotypu) měli významně nižší hodnoty kapacity oproti nositelům divokého genotypu ($P = 0,021$).

Polymorfismus *EPHX1-exonu 4* koreloval s výskytem jednořetězcových zlomů (SSB), mikrojader (MN) a hemoglobinových aduktů (Hb_{ad}). Významně vyšší množství MN ($P = 0,004$), Hb_{ad} ($P = 0,002$) a nižší množství SSB ($P = 0,002$) bylo zjištěno u divokých homozygotů ve srovnání s nositeli alespoň jedné variantní alely (heterozygoty, variantními homozygoty) kódující zvýšenou aktivitu enzymu. Nalezené závislosti obou polymorfismů *EPHX1* však nebyly podpořeny analýzou celkové aktivity *EPHX1*.

Významně nižší hladiny SSB byly zjištěny u jedinců se střední aktivitou *EPHX1* oproti jedincům s aktivitou vysokou ($P = 0,036$).

Polymorfismus *GSTM1* významně koreloval s metabolismem resp. s množstvím všech diastereomerů fenylhydroxyethyl merkapturové kyseliny (PHEMA) a s genotoxickým markerem resp. chromatidovým typem chromosomálních aberací (CTA). U nositelů delece *GSTM1* byla nalezena nižší množství PHEMA M1RR ($P < 0,001$), M1RS ($P < 0,001$), M2T ($P = 0,001$) a nižší hladiny CTA ($P = 0,042$) oproti nositelům funkčního *GSTM1*.

Pro polymorfismus *GSTT1* nebyla nalezena významná korelace ani s jedním ze sledovaných parametrů.

Polymorfismus v *GSTP1* významně koreloval s hlavními metabolity styrenu kyselinou mandlovou (MA) a kyselinou fenylglyoxalovou (PGA) ($P = 0,044$), s PHEMA M1RR ($P = 0,020$), PHEMA M2T ($P = 0,010$). Významně nižší hodnoty těchto metabolitů byly nalezeny u variantních než u divokých homozygotů. Korelace s genotoxicitou nebyla nalezena.

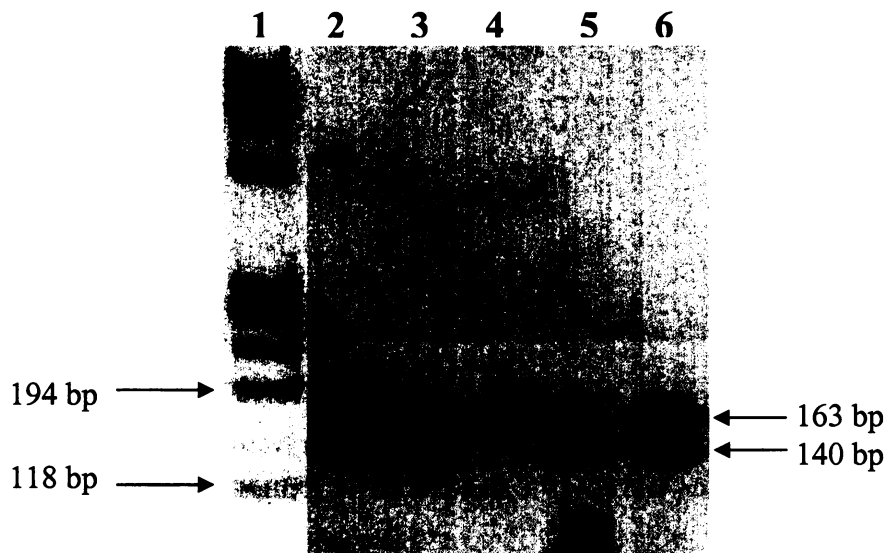
Největším rizikovým faktorem životního stylu pro vznik genotoxického poškození představoval vyšší věk a částečně délka pracovního poměru, která sebou přináší snížení reparační kapacity.

Závěrem lze konstatovat, že byly potvrzeny jak známé údaje (vztah *GSTM1* s metabolity styrenu), tak nalezeny nové, dosud nezveřejněné vztahy (vztah polymorfismů *GSTP1* k metabolitům styrenu a *EPHX1-exon 4* k markerům genotoxicity styrenu), naznačující značnou složitost problematiky a potřebu dalšího studia na větších a nezávislých souborech.

Diplomová práce byla součástí grantových projektů IGA 9422-3 a GAČR 310/03/0437.

8. PŘÍLOHY

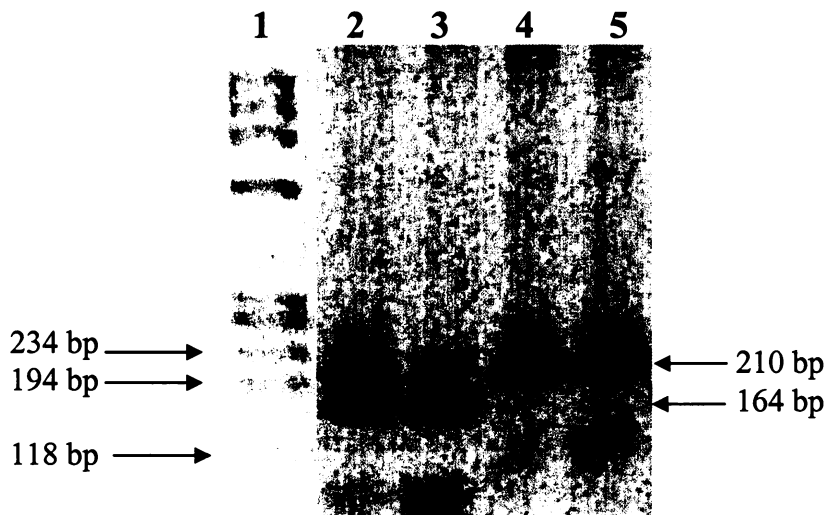
Ukázky genotypování enzymů metodou PCR-RFLP, podrobné podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.5.



Obrázek P1: Genotypování *EPHX1-exon 3*

Legenda: restriční enzym EcoRV; délka a teplota restrikce: 2 hodiny při 37°C; 3% agaróзовý gel

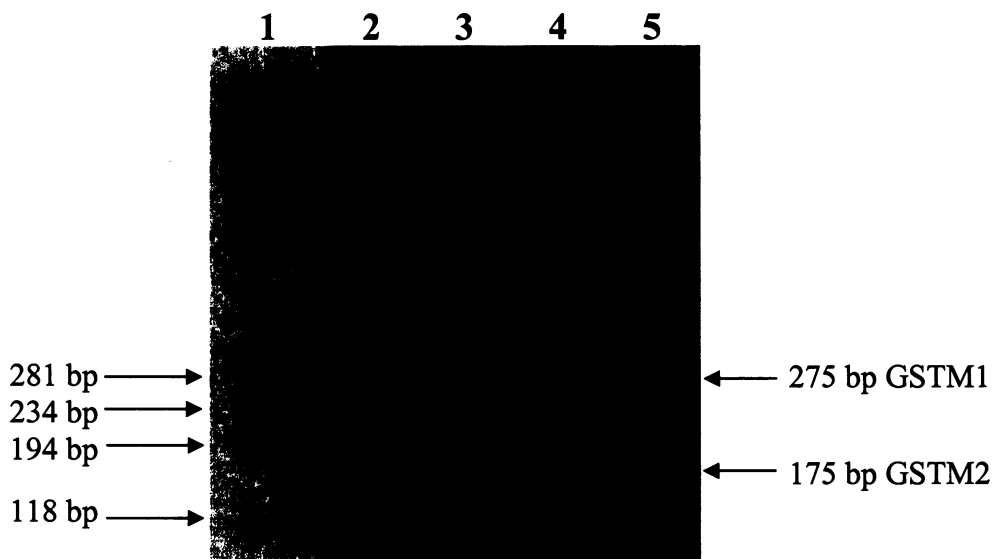
Vysvětlivky: 1 – marker Phi174/HaeIII; 2, 3, 6 - heterozygot; 4 - variantní homozygot; 5 - divoký homozygot



Obrázek P2: Genotypování *EPHX1-exon 4*

Legenda: restriční enzym RsaI; délka a teplota restrikce: 2 hodiny při 37°C; 3% agaróзовý gel

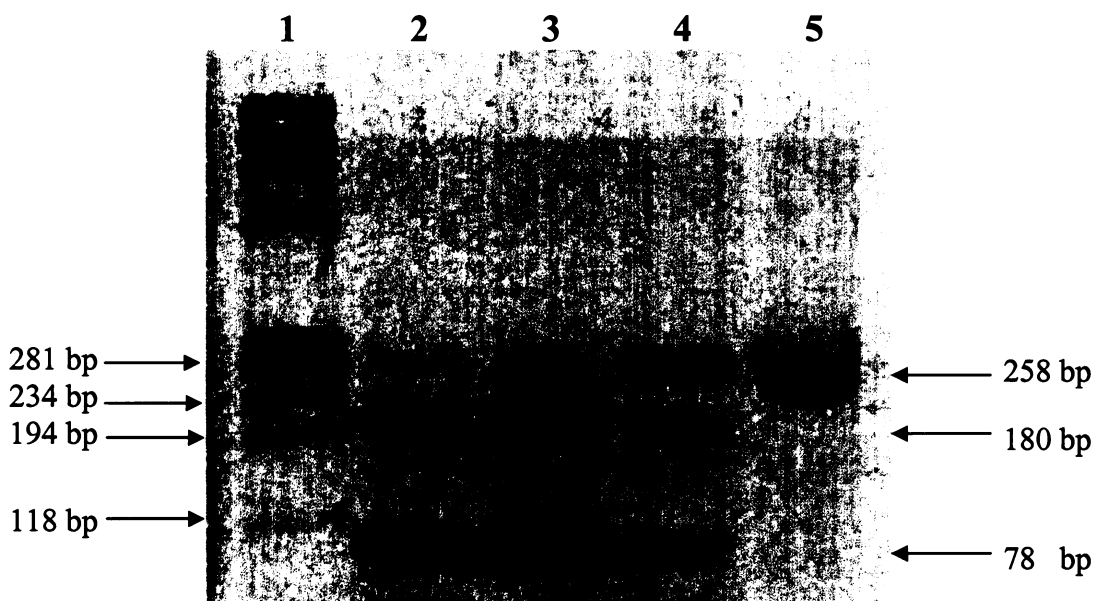
Vysvětlivky: 1 – marker Phi174/HaeIII; 2 - heterozygot, 3 - variantní homozygot, 4; 5 - divoký homozygot



Obrázek P3: Genotypování *GSTM1*

Legenda: PCR produkt, 3 % agarózový gel

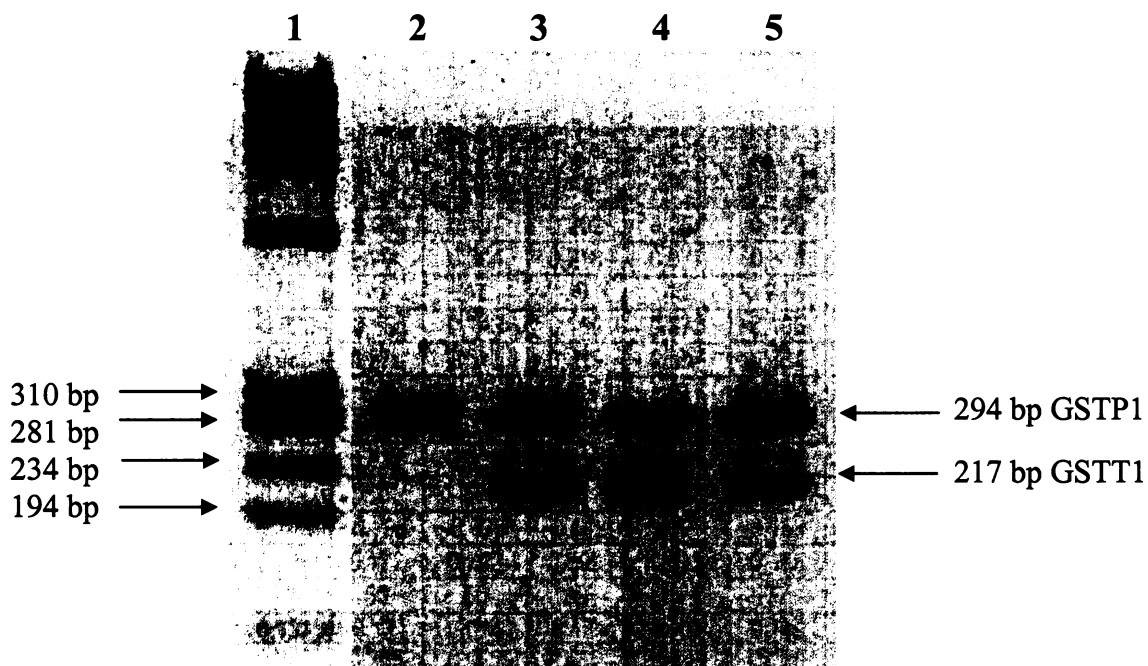
Vysvětlivky: 1 – marker Phi174/HaeIII; 2, 5 – *GSTM1*-null; 3, 4 – *GSTM1*-plus; *GSTM2* (175bp) - pozitivní kontrola



Obrázek P4: Genotypování *NQO2*

Legenda: restriční enzym SmlI; délka a teplota restrikce: 2 hodiny při 55 °C; 3 % agarózový gel

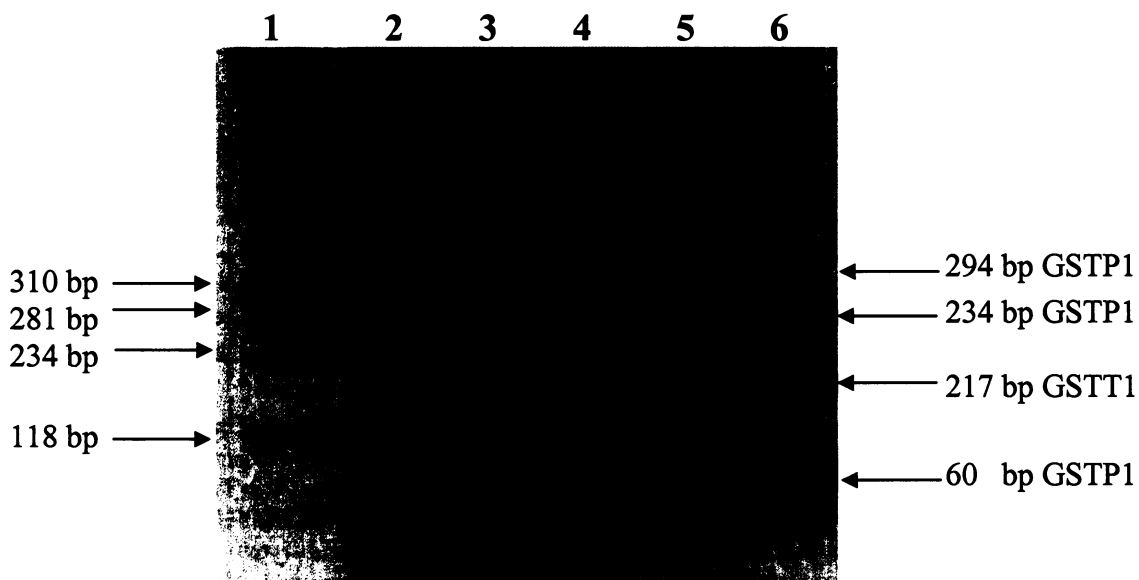
Vysvětlivky: 1 – marker Phi174/HaeIII ; 2, 3 - variantní homozygot, 4 - heterozygot; 5 - divoký homozygot;



Obrázek P5: Genotypování *GSTT1*

Legenda: PCR produkt, 3 % agarózový gel

Vysvětlivky: 1 – marker Phi174/HaeIII; 2 – *GSTT1-null*; 3, 4, 5 – *GSTT1-plus*; GSTP1 (294bp) - pozitivní kontrola



Obrázek P6: Genotypování *GSTP1*

Legenda: restriční enzym BsmAI; délka a teplota restriktce: 2 hodiny při 55 °C; 3 % agarózový gel

Vysvětlivky: 1 - marker Phi174/HaeIII; 2, 4 - heterozygot; 3, 5 - divoký homozygot; 6 - variantní homozygot

Tabulka P7: Závislosti biomarkerů expozice a genotoxického působení styrenu

Legenda: statisticky zhodnoceno Spearmanovým testem; R > 0, přímá závislost; R < 0, nepřímá závislost; P < 0,050, významná korelace

	R	0,048	0,056	-0,049	0,127	0,202	0,267	0,120	0,073	0,037	0,182
	P	0,693	0,644	0,745	0,394	0,218	0,077	0,314	0,540	0,757	0,175
	N	70	70	47	47	39	45	72	72	72	57
	R	0,027	-0,020	-0,156	0,143	0,159	0,273	0,105	0,100	-0,010	0,083
	P	0,822	0,869	0,270	0,313	0,319	0,057	0,364	0,388	0,930	0,529
	N	74	74	52	52	41	49	77	77	77	60
	R	0,072	0,130	-0,113	0,011	-0,165		0,125	0,021	0,093	
	P	0,547	0,274	0,434	0,938	0,316		0,281	0,857	0,422	
	N	73	73	50	50	39		77	77	77	
	R	0,139	0,143	-0,196	-0,038	-0,142		0,153	0,034	0,099	
	P	0,240	0,228	0,172	0,795	0,390		0,185	0,767	0,391	
	N	73	73	50	50	39		77	77	77	
	R	0,109	0,137	-0,131	0,014	-0,121		0,140	0,033	0,089	
	P	0,357	0,246	0,365	0,922	0,462		0,226	0,774	0,439	
	N	73	73	50	50	39		77	77	77	
	R	0,078	0,072	-0,063	-0,065	-0,090	0,125	0,047	-0,010	0,021	0,135
	P	0,514	0,544	0,665	0,652	0,587	0,403	0,684	0,933	0,853	0,310
	N	73	73	50	50	39	47	77	77	77	59
	R	0,021	0,106	-0,086	-0,015	-0,139	0,255	0,154	0,105	0,087	0,177
	P	0,859	0,373	0,553	0,918	0,398	0,084	0,182	0,365	0,452	0,180
	N	73	73	50	50	39	47	77	77	77	59
	R	0,065	0,094	-0,050	-0,042	-0,101	0,159	0,086	0,018	0,052	0,164
	P	0,582	0,430	0,730	0,771	0,541	0,287	0,459	0,879	0,654	0,215
	N	73	73	50	50	39	47	77	77	77	59
	R	0,188	-0,002	-0,233	0,028	-0,149	0,237	0,17	0,191	0,089	0,155
	P	0,113	0,988	0,104	0,848	0,364	0,108	0,141	0,098	0,444	0,246
	N	72	72	50	50	39	47	76	76	76	58
	R	0,141	-0,116	0,040	0,149	-0,012	0,066	0,000	0,052	-0,015	0,035
	P	0,239	0,333	0,782	0,302	0,943	0,659	0,998	0,654	0,898	0,795
	N	72	72	50	50	39	47	76	76	76	58
	R	0,080	0,080	-0,171	-0,003	-0,206	0,242	0,165	0,157	0,077	0,207
	P	0,503	0,503	0,234	0,985	0,208	0,102	0,153	0,175	0,506	0,119
	N	72	72	50	50	39	47	76	76	76	58

Vysvětlivky: St.p. = statistické parametry; N = velikost souboru; S_{vzduch} = koncentrace styrenu ve vzduchu; S_{krv} = koncentrace styrenu v krvi; MA = kyselina mandlová; PGA = kyselina fenyglyoxalová; VP-G = glukuronid vinylfenolu; VP-S = sulfát vinylfenolu; VP-GS = VP-G + VPS = celkové množství konjugátů VP; PHEMA(M1RR,M1RS,M2T) = diastereomery fenyhydroxyethyl merkapturové kyseliny; MN = mikrojádra; BN + MN = dvoujaderné buňky s mikrojádry; SSB = jednořetězové zlomy DNA; SSB_{endo} = jednořetězové zlomy vyvolané endonukleázou III; RCGy = reparační kapacity po ozáření 5 Gy; RCOHG = reparační kapacita po vyvolání 8-oxoguaninových aduktů; CA_{total} = celkový počet chromosomálních aberací; CTA = chromatidový typ CA; CSA = chromosomový typ CA; Hb_{ad} = hemoglobinové adukty;

Tabulka P8: Závislosti biomarkerů genotoxického působení styrenu

Legenda: statisticky zhodnoceno Spearmanovým testem; R = 1, zcela přímá závislost; R > 0, přímá závislost; R < 0, nepřímá závislost; P < 0,050, významná korelace

		SSB	SSB _{endo}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	Hb _{ad}
MN	R	-0,259	-0,136	-0,151		0,025	-0,006	0,010	0,133
	P	0,070	0,346	0,354		0,826	0,958	0,934	0,304
	N	50	50	40		78	78	78	62
BN + MN	R	0,006	-0,065	-0,086	0,280	0,167	0,170	0,090	0,156
	P	0,968	0,652	0,596	0,054	0,144	0,137	0,433	0,225
	N	50	50	40	48	78	78	78	62
SSB	R		-0,134	0,094		0,044	-0,039	0,063	
	P		0,333	0,547		0,751	0,781	0,649	
	N		54	43		54	54	54	
SSB _{endo}	R				-0,246	0,038	0,138	-0,067	-0,242
	P				0,082	0,786	0,321	0,629	0,117
	N				51	54	54	54	43
RCGy	R					-0,193	-0,006	-0,215	-0,318
	P					0,216	0,968	0,166	0,071
	N					43	43	43	33
RCOHG	R					0,093	-0,023	0,171	0,132
	P					0,518	0,874	0,229	0,411
	N					51	51	51	41
CA _{total}	R								0,019
	P								0,883
	N								65
CTA	R								-0,018
	P								0,870
	N								83
CSA	R								0,040
	P								0,753
	N								65
Hb _{ad}	R								
	P								
	N								

Vysvětlivky: St.p.= statistické parametry; N = velikost souboru; MN = mikrojádra; BN + MN = dvoujaderné buňky s mikrojádry; SSB = jednořetězcové zlomy DNA; SSB_{endo} = jednořetězcové zlomy vyvolané endonukleázou III; RCGy = reparační kapacity po ozáření 5 Gy; RCOHG = reparační kapacita po vyvolání 8-oxoguaninových aduktů; CA_{total} = celkový počet chromosomálních aberací; CTA = chromatidový typ CA; CSA = chromosomový typ CA; Hb_{ad} = hemoglobinové adukty;

**Tabulky P9-P23: ZÁVISLOSTI MEZI POLYMORFISMY V ENZYMECH METABOLIZUJÍCÍCH STYREN A BIOMARKERY EXPOZICE
A GENOTOXICKÉHO ÚČINKU STYRENU**

Tabulka P9: EPHX1-exon 3: Kruskal-Wallis test

Test (a,b)		MA	PGA	MA + PGA	VP-G	VP-S	VP-GS	MIRR	MIRS	PREMA M2T	MN	BN+MN	SSB	SSB _{mult}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	HB _{adj}
Chi-Square	0,671	1,534	0,665	1,234	0,334	0,321	0,171	0,291	3,307	0,938	2,331	3,861	1,704	1,404	0,528	5,406	3,234	2,757	2,222	0,655
df	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
P	0,715	0,464	0,717	0,54	0,846	0,652	0,918	0,865	0,191	0,626	0,312	0,145	0,427	0,496	0,768	0,067	0,199	0,252	0,329	0,721

Výsvětlivky: (a) Kruskal Wallis Test; (b) I = divoký homozygot, 2 = heterozygot, 3 = variantní homozygot; S_{svazch} = koncentrace styrenu ve vzduchu; S_{svet} = koncentrace styrenu v krvi; MA = kyselina mandlová; VP-G = glukuronid vinyfenolu; VP-S = sulfát vinyfenolu; VP-GS = VP-G + VP-S =celkové množství konjugátů VP; PREMA(MIRR, MIRS, M2T) = diastereomery fenylhydroxyethyl merkapturové kyseliny; PGA = kyselina fenylglyoxalová; MN = mikrojdra; BN + MN = dvojjaderné buňky a mikrojdra; SSB = jednofetězové zlomy DNA; SSB_{mult} = jednofetězové zlomy vyvolané endonukleázou III; RCGy = reparační kapacity po ozáření 5 Gy; RCOHG = reparační kapacita po vyvolání 8 oxoguaninových aduktů; CA_{total} = celkový počet chromosomálních aberačí; CTA = chromatický typ CA; CSA = chromosomový typ CA; HB_{adj} = hemoglobinové adukty

Tabulka P10: EPHX1-exon 3 (divoký homozygot vs. variantní homozygot): Mann-Whitney Test

Test (b)		MA	PGA	MA + PGA	VP-G	VP-S	VP-GS	MIRR	MIRS	PREMA M2T	MN	BN+MN	SSB	SSB _{mult}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	HB _{adj}
Mann-Whitney U	90	107	98,5	103,5	89	98	109	80,5	88,5	77	83	59,5	33,5	40	17	24,5	69,5	71	87	56
Wilcoxon W	756	841	119,5	124,5	602	119	812	95,5	791,5	92	104	80,5	333,5	50	227	34,5	90,5	92	108	73
Z	-0,647	-0,479	-0,438	-0,263	-0,421	-0,456	-0,07	-0,466	-0,158	-0,602	-1,137	-1,92	-0,952	-0,538	-0,343	-1,386	-1,608	-1,597	-1,108	-0,705
P	0,518	0,632	0,661	0,793	0,674	0,649	0,944	0,641	0,874	0,547	0,256	0,055	0,341	0,591	0,732	0,166	0,108	0,11	0,268	0,481
P (Fisherův test)	0,539(e)	0,605(e)	0,669(e)	0,798(e)	0,694(e)	0,669(e)	0,959(e)	0,651(e)	0,880(e)	0,571(e)	0,271(e)	0,053(e)	0,355(e)	0,635(e)	0,779(e)	0,172(e)	0,114(e)	0,131(e)	0,333(e)	0,508(e)

Výsvětlivky: (a) svázané hodnoty nebyly korigovány, (b) I = divoký homozygot, 3 = variantní homozygot, ostatní zkratky viz. tabulka P9 str. 77

Tabulka P11: EPHX1-exon 3 (divoký homozygot vs. heterozygot + variantní homozygot): Mann-Whitney Test

Test (b)		MA	PGA	MA + PGA	VP-G	VP-S	VP-GS	MIRR	MIRS	PREMA M2T	MN	BN+MN	SSB	SSB _{mult}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	HB _{adj}
Mann-Whitney U	485	515	473,5	456,5	535,5	496,5	514,5	488,5	398,5	483,5	480	499,5	176,5	201,5	126	120,5	583	477	557	308
Wilcoxon W	816	921	908,5	891,5	970,5	831,5	946,5	866,5	776,5	1186,5	976	895,5	476,5	501,5	231	310,5	1048	942	1337	608
Z	-0,043	-0,221	-0,814	-1,034	-0,013	-0,517	-0,284	-0,15	-1,428	-0,218	-1,473	-1,242	-1,26	-0,66	-0,49	-2,314	-0,024	-1,353	-0,37	-0,715
P	0,966	0,825	0,317	0,301	0,99	0,605	0,776	0,881	0,153	0,828	0,141	0,214	0,208	0,51	0,624	0,021	0,98	0,176	0,711	0,475
P (Fisherův test)														0,641(e)						

Výsvětlivky: (a) svázané hodnoty nebyly korigovány, (b) I = divoký homozygot, 4 = heterozygot nebo variantní homozygot, ostatní zkratky viz. tabulka P9 str. 77

Tabulka P12: EPHX1-exon 4: Kruskal-Wallis Test

Test (a,b)																				
	S _{total}	S _{new}	MA	PGA	MA +PGA	VP-G	VP-S	VP-GS	PREMA MIRR	PREMA MIRS	PREMA M2T	BN+MN	SSB	SSB _{mod}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	HB _{add}
Chi-Square	3,571	0,152	0,839	0,632	0,636	1,07	1,14	0,867	1,883	0,659	0,087	0,02	10,21	3,835	1,488	2,802	1,022	1,659	0,27	6,659
df	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
P	0,168	0,927	0,657	0,779	0,727	0,586	0,565	0,648	0,431	0,719	0,957	0,89	0,006	0,147	0,475	0,272	0,6	0,436	0,874	0,036

Ťysvětlivky: (a) Kruskal Wallis Test, (b) 1 = divoký homozygot, 2 = heterozygot, 3 = variantní homozygot, ostatní zkratky viz. tabulka P9 str. 77

Tabulka P13: EPHX1-exon 4 (divoký homozygot vs. variantní homozygot): Mann-Whitney Test

Test (b)																				
	S _{total}	S _{new}	MA	PGA	MA +PGA	VP-G	VP-S	VP-GS	PREMA MIRR	PREMA MIRS	PREMA M2T	BN+MN	SSB	SSB _{mod}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	HB _{add}
Mann-Whitney U	55	96,5	84	106	96	81	100	85,5	90	89	91	106	28	17	22	37	102,5	106,5	108	20
Wilcoxon W	796	999,5	1030	121	1042	1027	1046	1031,5	105	909	106	1052	463	452	298	415	117,5	1096,5	123	23
Z	-1,516	-0,293	-0,783	-0,051	-0,388	-0,894	-0,253	-0,743	-0,361	-0,411	-0,325	-0,051	-1,002	-1,727	-0,1	-0,242	-0,251	-0,12	-0,071	-0,967
P	0,13	0,769	0,428	0,96	0,698	0,371	0,8	0,458	0,718	0,681	0,745	0,96	0,316	0,084	0,92	0,809	0,802	0,904	0,943	0,334
P (Fisherův test)	0,198(e)	0,776(e)	0,449(e)	0,974(e)	0,719(e)	0,392(e)	0,819(e)	0,469(e)	0,799(e)	0,713(e)	0,766(e)	0,974(e)	0,349(e)	0,096(e)	0,960(e)	0,845(e)	0,810(e)	0,911(e)	0,962(e)	0,364(e)

Ťysvětlivky: (a) svázané hodnoty nebyly korigovány, (b) 1 = divoký homozygot, 3 = variantní homozygot, ostatní zkratky viz. tabulka P9 str. 77

Tabulka P14: EPHX1-exon 4 (divoký homozygot vs. heterozygot + variantní homozygot): Mann-Whitney Test

Test (b)																				
	S _{total}	S _{new}	MA	PGA	MA +PGA	VP-G	VP-S	VP-GS	PREMA MIRR	PREMA MIRS	PREMA M2T	BN+MN	SSB	SSB _{mod}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	HB _{add}
Mann-Whitney U	455	495,5	513,5	480,5	481	505	476,5	514	407,5	473,5	492	569	95	211	105	157	495	489	536,5	186
Wilcoxon W	1196	1399,5	1459,5	760,5	781	1451	776,5	1460	732,5	796,5	817	947	530	646	381	277	846	840	887,5	406
Z	-0,281	-0,569	-0,033	-0,726	-0,327	-0,144	-0,517	-0,026	-1,247	-0,371	-1,108	-0,139	-3,033	-0,164	-1,147	-1,194	-0,947	-1,042	-0,47	-2,58
P	0,779	0,712	0,974	0,468	0,744	0,886	0,605	0,979	0,212	0,711	0,914	0,89	0,002	0,87	0,251	0,232	0,344	0,287	0,639	0,01
P (Fisherův test)															0,263(e)					

Ťysvětlivky: (a) svázané hodnoty nebyly korigovány, (b) 1 = divoký homozygot, 4 = heterozygot nebo variantní homozygot, ostatní zkratky viz. tabulka P9 str. 77

Tabulka P15: EPHX1 aktivita: Kruskal-Wallis Test

Test (a,b)																								
	$S_{y_{statik}}$	S_{new}	MA	PGA	MA +PGA	VP-G	VP-S	VP-GS	PREMA	MIRR	PREMA	MIRS	PREMA	MZT	MN	BN+MN	SSB	SSB _{medo}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	HB _{add}
Chi-Square	0,03	0,087	0,278	0,169	0,068	0,246	1,441	0,078	1,183	2,682	0,72	2,682	0,72	0,604	3,544	4,269	1,091	2,929	2,71	0,54	0,631	0,326	2,866	
df	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
P	0,985	0,957	0,87	0,919	0,966	0,884	0,487	0,962	0,553	0,262	0,698	0,262	0,739	0,17	0,118	0,58	0,231	0,258	0,763	0,73	0,85	0,239		

Vysvětlivky: (a) Kruskal Wallis Test, (b) 1 = nízká, 2 = střední, 3 = vysoká aktivita, ostatní zkratky viz. tabulka P9 str. 77

Tabulka P16: EPHX1-aktivita (nízká vs. střední): Mann-Whitney Test

Test (b)																								
	$S_{y_{statik}}$	S_{new}	MA	PGA	MA +PGA	VP-G	VP-S	VP-GS	PREMA	MIRR	PREMA	MIRS	PREMA	MZT	MN	BN+MN	SSB	SSB _{medo}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	HB _{add}
Mann-Whitney U	271,5	306	336,5	332,5	338,5	319,5	310	335	283	256	278	256	278	328,5	255	120,5	133	48	87,5	337	323,5	346	210,5	
Wilcoxon W	407,5	477	1002,5	522,5	528,5	985,5	500	1001	923	886	431	886	431	1108,5	445	351,5	238	103	192,5	1078	513,5	1087	315,5	
Z	-0,01	-0,33	-0,097	-0,168	-0,062	-0,398	-0,566	-0,124	-0,088	-0,859	-0,38	-0,859	-0,38	-0,696	-1,914	-0,892	-0,477	-1,687	-1,658	-0,412	-0,659	-0,276	-0,159	
P (Fisherův test)	0,992	0,741	0,922	0,866	0,951	0,68	0,571	0,901	0,83	0,391	0,704	0,391	0,704	0,486	0,056	0,372	0,633	0,092	0,097	0,681	0,51	0,782	0,873	

Vysvětlivky: (a) svázané hodnoty nebyly korigovány, (b) 1 = nízká, 2 = střední, ostatní zkratky viz. tabulka P9 str. 77

Tabulka P17: EPHX1-aktivita (střední vs. vysoká)

Test (b)																								
	$S_{y_{statik}}$	S_{new}	MA	PGA	MA +PGA	VP-G	VP-S	VP-GS	PREMA	MIRR	PREMA	MIRS	PREMA	MZT	MN	BN+MN	SSB	SSB _{medo}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	HB _{add}
Mann-Whitney U	195,5	212,5	180	180,5	187,5	193	153	188,5	169	145,5	176,5	145,5	176,5	228,5	222,5	41	63	55	68	204	202	211,5	76,5	
Wilcoxon W	273,5	878,5	846	246,5	853,5	859	219	254,5	247	775,5	254,5	775,5	254,5	306,5	300,5	272	99	81	104	282	280	289,5	114,5	
Z	-0,213	-0,083	-0,452	-0,44	-0,264	-0,126	-1,131	-0,239	-1	-1,638	-0,817	-1,638	-0,817	-1,122	-0,255	-2,068	-1,041	-0,551	-0,425	-0,555	-0,618	-0,409	-1,583	
P (Fisherův test)	0,832	0,934	0,651	0,66	0,792	0,9	0,288	0,811	0,317	0,101	0,414	0,101	0,414	0,903	0,798	0,036	0,288	0,582	0,671	0,579	0,536	0,683	0,114	

Vysvětlivky: (a) svázané hodnoty nebyly korigovány, (b) 2 = střední, 3 = vysoká, ostatní zkratky viz. tabulka P9 str. 77

Tabulka P18: EPHX1-aktivita (nízká vs. vysoká)

		Test (b)																				
		S _{zobch}	S _{new}	MA	PGA	MA + PGA	VP-G	VP-S	VP-GS	PREMA MIRR	PREMA MIRS	PREMA M2T	MN	BN+MN	SSB	SSB _{mod}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	HB _{adj}
Mann-Whitney U		95	105,5	92	101	100	92	87	89	80	90	81	88	89	40	48	29	44	88,5	110	101,5	33,5
Wilcoxon W		173	276,5	282	167	280	158	153	165	158	243	169	176	279	145	84	84	149	176,5	300	179,5	89,5
Z		-0,046	-0,106	-0,538	-0,151	-0,194	-0,538	-0,753	-0,237	-0,974	-0,54	-0,487	-0,65	-1,014	-1,092	-0,566	-0,977	-0,819	-0,637	-0,168	-0,567	-1,536
P		0,963	0,916	0,591	0,88	0,946	0,591	0,451	0,813	0,33	0,59	0,626	0,515	0,311	0,275	0,572	0,328	0,413	0,524	0,866	0,571	0,125
P (Fisherův test)		0,982(e)	0,917(e)	0,611(e)	0,899(e)	0,966(e)	0,611(e)	0,471(e)	0,832(e)	0,347(e)	0,616(e)	0,447(e)	0,535(e)	0,326(e)	0,297(e)	0,516(e)	0,360(e)	0,441(e)	0,535(e)	0,889(e)	0,617(e)	0,127(e)

Vysvětlivky: (a) svázané hodnoty nebyly korigovány, (b) 1 = nízká, 3 = vysoká aktivita, ostatní zkratky viz. tabulka P9 str. 77

Tabulka P19: GSTP1-exon 5: Kruskal-Wallis Test

		Test (a,b)																				
		S _{zobch}	S _{new}	MA	PGA	MA + PGA	VP-G	VP-S	VP-GS	PREMA MIRR	PREMA MIRS	PREMA M2T	MN	BN+MN	SSB	SSB _{mod}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	HB _{adj}
Chi-Square		2,61	4,881	8,032	7,684	8,046	3,819	3,932	4,429	10,133	4,904	8,622	1,286	0,508	1,204	0,515	1,232	2,73	1,371	3,743	0,14	5,511
df		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
P		0,271	0,087	0,018	0,021	0,018	0,148	0,14	0,109	0,006	0,086	0,013	0,525	0,776	0,548	0,773	0,54	0,255	0,504	0,154	0,932	0,064

Vysvětlivky: (a) Kruskal Wallis Test, (b) 1 = divoký homozygot, 2 = heterozygot, 3 = variantní homozygot, ostatní zkratky viz. tabulka P9 str. 77

Tabulka P20: GSTP1-exon 5 (divoký homozygot vs. variantní homozygot): Mann-Whitney Test

		Test (b)																				
		S _{zobch}	S _{new}	MA	PGA	MA + PGA	VP-G	VP-S	VP-GS	PREMA MIRR	PREMA MIRS	PREMA M2T	MN	BN+MN	SSB	SSB _{mod}	RCGy	RCOHG	CA _{total}	CTA	CSA	HB _{adj}
Mann-Whitney U		36	29	25	22	23	33	28,5	28,5	18	26,5	15	43,5	50,5	13	20	12	15	41	29,5	50	24,5
Wilcoxon W		57	50	46	43	44	54	49,5	49,5	39	47,5	36	64,5	240,5	79	30	48	70	62	50,5	221	39,5
Z		-1,201	-1,667	-1,933	-2,133	-2,067	-1,4	-1,7	-1,7	-2,311	-1,852	-2,521	-0,86	-0,414	-1,175	-0,266	-0,679	-0,707	-0,879	-1,686	-0,299	-1,135
P		0,23	0,096	0,053	0,033	0,039	0,162	0,089	0,089	0,021	0,064	0,012	0,39	0,679	0,24	0,79	0,497	0,48	0,38	0,092	0,765	0,256
P (Fisherův test)		0,251(e)	0,104(e)	0,056(e)	0,033(e)	0,040(e)	0,177(e)	0,090(e)	0,090(e)	0,020(e)	0,087(e)	0,010(e)	0,400(e)	0,687(e)	0,280(e)	0,851(e)	0,570(e)	0,539(e)	0,415(e)	0,104(e)	0,820(e)	0,266(e)

Vysvětlivky: (a) svázané hodnoty nebyly korigovány, (b) 1 = divoký homozygot, 3 = variantní homozygot, ostatní zkratky viz. tabulka P9 str. 77

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: Genetická rozmanitost, v knize *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky*, Espero, Ústí nad Labem, str. 278-310 (1998)

Ali-Osman, F., Akande, O., Antoun, G., Mao, J.X., Buolamwini, J.: *J. Biol. Chem.* 272, 10004-100012 (1997)

Ames, B.N.: *Mutat. Res.* 475, 7-20 (2001)

Benhamou, S., Reinikainen, M., Bouchardy, C., Dayer, P., Hirvonen, A.: *Cancer Res.* 58, 5291-5293 (1998)

Bergman, M., Ahnstrom, M., Palmeback-Wegman, P., Wingren, S.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 131, 439-44 (2005)

Bernardini, S., Hirvonen, A., Jarventaus, H., Norppa, H: *Carcinogenesis* 23, 893-897 (2002)

Board, P.G.: *FEBS Lett.* 135, 12-14 (1981)

Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Casalone, R., Dalpra, L., De Ferrari, M., Degrassi, A.F., Lamberti, L., Lando, C., Migliore, L., Padovani, P., Pasquini, R., Puntoni, R., Sbrana, I., Stella, M., Bonassi, S.: *Cancer Epidemiol.* 6, 249-256 (1997)

Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Landol, C., Peter Chang, W., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E.: *Carcinogenesis* 28, 625-631 (2007)

Brdička, R.: *Lidský genom na rozhraní tisíciletí*, Grada, Praha (2001)

Burris, H.A., Moore, M.J., Andersen, J.: *J. Clin. Oncol.* 15, 2403-2413 (1997)

Buschini, A., De Palma, G., Poli, P., Martiono, A., Rossi, C., Mozzoni, P., Scotti, E., Buzio, L., Bergamashi, E., Mutti, A.: *Environ. Mol. Mutagen.* 41, 243-252 (2003)

Campo, S., Sardo, A.M., Campo, G.M., Ascola, A.D., Avenoso, A., Castaldo, M., Saitta, C., Lania, A., Saitta, A., Calatroni, A.: *Mutat. Res.* 578, 143-148 (2005)

Carlsten, C., Sagoo, G., Frodsham, A., Burke, W., Higgins, J.: *Am. J. Epidemiol.* 167, 759-774 (2008)

- Collins, A.R., Dusinska, M., Horvathova, E., Munro, E., Savio, M., Stetina, R.: *Mutagenesis* 16, 297-301 (2001)
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Stetina, R.: *Mutagenesis* 23, 143-151 (2008)
- Cowell, I.G., Dixon, K.H., Pemble, S.E., Ketterer, B., Taylor, J.B.: *Biochem. J.* 255(1), 79-83 (1988)
- Cullen, J.J., Weydert, Ch., Hinkhouse, M.M., Ritchie, J., Domann, F.E., Spitz, D., Oberley, L.W.: *Cancer Res.* 63, 1297-1303 (2003)
- Daly, A.K., Cholerton, S., Gregory, W., Idle, J.R.: *Pharmacol. Ther.* 57, 129-160 (1993)
- De Palma, Manini, P., Mozzoni, P., Andreoli, R., Bergamaschi, E., Cavazzini, S.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1393-1400 (2001)
- Egan, K.M., Cai, Q., Shu, X., Jin, F., Zhu, T., Dai, Q., Gao, Y-T., Zheng, W.: *Cancer Epidemiol.* 13, 197-204 (2004)
- Feick, P., Gerloff, A., Singer, M.V.: *Pancreatology* 7, 124-130 (2007)
- Folz, R.J., Crapo, J.D.: *Genomics* 22, 162-171 (1994)
- Forsberg, L., de Faire, U., Morgenstern, R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 389, 84-93 (2001)
- Godderis, L., De Boeck, M., Haufroid, V., Emmery, M., Mateuca, R., Gardinal, S., Kirsch-Volders, M., Veulemans, H., Lison, D.: *Environ. Mol. Mutagen.* 44, 293-303 (2004)
- Graves, P.R., Kwiek, J.J., Fadden, P., Ray, R., Hardeman, K., Coley, A.M.: *Mol. Pharmacol.* 62, 1364-72 (2002)
- Grosová, L.: *Diplomová práce, Praha* (2006)
- Hartus, M.J., Coggan, M., Langton, L., Wilson, S.R., Board, P.G.: *Pharmacogenetics* 8, 27-31 (1998)
- Hassett, C., Aicher, L., Sidhu, J.S., Omiecinski, C.J.: *Hum. Mol. Genet.* 3(3), 421-428 (1994b)
- Hassett, C., Robinson, K.B., Beck, N.B., Omiecinski, C.J.: *Genomics* 23, 433-442 (1994a)
- Haufroid, V., Buchet, J.P., Gardinal, S., Lison, D.: *Int. Arch. Environ. Health* 75, 453-458 (2002)
- Hayes, J.D., Pulford, D.J.: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445-600 (1995)

- Hayes, J.D., Strange, R.C.: *Pharmacology* 61(3), 154-66 (2000)
- Henderson, L.M., Speit, G.: *Mutat. Res.* 589, 158-191 (2005)
- Hubáčková, M.: osobní sdělení
- Hung, R.J., Boffetta, P., Brennan, P., Malaveille, Ch., Gelatti, U., Placidi, D., Carta, A., Hautefeuille, A., Porru, S.: *Arch. Biochem. Biophys.* 25, 973-978 (2004)
- Chen, Y., Farmer, A.A., Chen, C.F., Jones, D.C., Chen, P.L., Lee, W.H.: *Cancer Res.* 56, 3168-72 (1996)
- Church, S.L., Grant, J.W., Meese, E.U., Trent, J.M.: *Genomics* 14, 823-825 (1992)
- IARC: WHO 60, (1994)
- IARC: WHO 82, (2002)
- Iskander, K., Paquet, M., Brayton, C., Jaiswal, A.K.: *Cancer Res.* 64, 5925-5928 (2004)
- Jaiswal, A.K., Bell, D.W., Radjendirane, V., Testa, J.R.: *Pharmacogenetics* 9, 313-418 (1999)
- Jamieson, D., Wilson, K., Pridgeon, S., Margetts, J.P., Edmondson, R.J., Leung, H.Y., Knox, R., Boddy, A.V.: *Clin. Cancer Res.* 13, 1584-1590 (2007)
- Johanson, G., Ernstgard, E., Osterman-Golkar, S., Williams, C.C., Sumner, S.C.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 36-49 (2000)
- Kang, D., Lee, K., Park, S.K., Berndt, S.I., Peters, U., Reding, D., Chatterjee, N., Welch, R., Chanock, S., Huang, W., Hayes, R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16(8), 1581-86 (2007)
- Kao-Shan, C.S., Fine, R.L., Whang-Peng, J., Lee, E.C., Chabner, B.A.: *Cancer Res.* 47, 6278-6282 (1987)
- Karlsson, K., Marklund, S.L.: *Biochem. J.* 242, 55-59 (1987)
- Kirsch-Volders, M., Mateuca, R.A., Roelants, M., Tremp, A., Zeiger, E., Bonassi, S., Holland, N., Norppa, H., Teixeira, J.P., Zijno, A., Fenech, M.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15(5), 1038-42 (2006)
- Klener, P.: *Klinická onkologie, Galén a KU, Praha* (2002)
- Klener, P.: *Protinádorová chemoterapie, Galén, Praha* (1996)
- Köhlerová, R.: *Lék. Zpr. LF UK Hradec Králové* 48, 173-180 (2003)

- Kollarova, H., Janoutova, G., Foretova, L., Martinek, A., Shonova, O., Prochazka, V., Horakova, D., Cizek, L., Janout, V.: *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 56, 38-43 (2007)
- Komárek, L., Bencko, V., Mika, J., Rettich, F., Svobodová, A., Vesela, J., Volf, J.: *Standardní operační postupy pro biologické monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí*, Státní zdravotní ústav, Praha (2003)
- Koskinen, M., Vodicka, P., Hemminki, K.: *Chem. Biol. Interact.* 124, 13-27 (2000)
- Koutecký, J.: *Klinická onkologie*, Riopress, Praha (2004)
- Laffon, B., Perez-Cadahia, B., Pasaro, E., Mendez, J.: *Mutat. Res.* 536, 49-59 (2003)
- Landeghem, G.F., Tabatabaie, P., Kucinskas, V., Saha, N., Beckman, G.: *Hum. Hered.* 49, 190-193 (1999)
- Li, D., Day, R.S., Bondy, M.L., Sinha, R., Nguyen, N.T., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Hassan, M.M.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16(4), 655-661 (2007)
- Liao, S., Williams-Ashman, H.G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 208-13 (1961)
- Long, D.L., Jaiswal, A.K.: *Chem. Biol. Interact.* 129, 99-112 (2000)
- Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P.: *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 20, 197-209 (2006)
- Manini, P., Buzio, L., Andreoli, R., Goldoni, M., Bergamaschi, E., Jakubowski, M., Vodicka, P., Hirvonen, A., Mutti, A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189, 160-169 (2003)
- Manini, P., De Palma, G., Mozzoni, P., Andreoli, R., Poli, D., Bergamaschi, E., Franchini, I., Mutti, A.: *Toxicol. Lett.* 134, 201-208 (2002)
- Mannervik, B., Danielson, U.H.: *Crit. Rev. Biochem.* 23(3), 283-337 (1988)
- Masimirembwa, C.M., Dandara, C., Sommers, D.K., Snyman, J.R., Hasler, J.A.: *Pharmacogenetics* 8, 83-85 (1998)
- Masopust, J., Průša, R.: *Patobiochemie buňky, skriptum 2. LF UK Praha*, str. 260-293 (2003)
- McCord, M., Fridovich, I.: *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055 (1969)
- McGlynn, K.A., Rosvold, E.A., Lustbader, E.D., Hu, Y., Clapper, M.L., Zhou, T., Wild, C.P., Xia, X.L., Baffoe-Bonnie, A., Ofori-Adjei, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 2384-2387 (1995)
- Menzel, H.J., Sarmanova, J., Soucek, P., Berberich, R., Grunewald, K., Haun, M., Kraft, H.G.: *Br. J. Cancer.* 90, 1989-1994 (2004)

- Migliore, L., Botto, N., Scarpato, R., Petrozzi, L., Cipriani, G., Bonuccelli, U.: *Cytogenet. Cell Genet.* 87, 41-46 (1999)
- Migliore, L., Naccarati, A., Coppede, F., Bergamaschi, E., De Palma, G., Voho, A., Manini, P., Jarventaus, H., Mutti, A., Norppa, H., Hirvonen, A.: *Pharmacogenet. Genomics.* 16(2), 87-99 (2006)
- Mitrunen, K., Sillanpaa, P., Kataja, V.: *Carcinogenesis* 22, 827-829 (2001)
- Mocellin, S., Rossi, C.R., Pilati, P., Nitti, D., Marincola, F.M.: *Trends Mol. Med.* 9, 189-195 (2003)
- Moscow, J.A., a spol., : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6518-6522 (1988)
- Musak, L., Soucek, P., Vodickova, L., Naccarati, A., Halasova, E., Polakova, V., Slyskova, J., Susova, S., Bunchancova, J., Smerhovsky, Z., Sedikova, J., Klimentova, G., Osina, O., Hemminki, Vodicka, P.: *Mutat. Res.* 641, 36-42 (2008)
- Naccarati, A., Soucek, P., Stetina, R., Haufroid, V., Kumar, R., Vodickova, L., Trtkova, K., Dusinska, M., Hemminki, K., Vodicka, P.: *Mutat. Res.* 503, 22-31 (2006)
- Nakajima, Z., Elovaara, E., Gonzales, F.J., Gelboin, H.J., Vainio, H., Aoyama, T.: *IARC Sci. Publ.* 45, 101-108 (1993)
- Nakazato, H., Sizuki, K., Matsui, H.: *Anticancer Res.* 23, 2897-2902 (2003)
- Naoe, T., Takeyama, K., Yokozawa, T., Kiyoi, H., Seto, M., Uike, N., Ino, T., Utsunomiya, A., Maruta, A., Jin-nai, I., Kamada, N., Kubota, Y., Nakamura, H., Shimazaki, C., Horiike, S., Kodera, Y., Saito, H., Ueda, R., Wiemels, J., Ohno, R.: *Clin. Cancer Res.* 6, 4091-4095 (2000)
- Nebert, D.W., Roe, A.L., Vandale, S.E., Bingham, E., Oakley, G.G.: *Genet. Med.* 4, 62-70 (2002)
- Oesch, F.: *Xenobiotika* 3, 305-340 (1973)
- Omiecinski, C.J., Aicher, L., Swenson, L.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 269(1), 417-423 (1994)
- Park, S.J., Zhao, H., Spitz, M. R., Grossmann, H.B., Wu, X.: *Mut. Res.* 536, 131-137 (2003)
- Pemble, S., Schroeder, K.R., Spenser, S.R., Meyer, D.J., Hallier, E., Bolt, H.M., Ketterer, B., Taylor, J.B.: *Biochem. J.* 300, 271-276 (1994)
- Racek, J., Holeček, V.: *Chem. Listy* 93, 774-780 (1999)
- Racek, J.: *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*, Galén, Praha (2003)
- Rosenblum, J.S., Gilula, N.B., Lerner, R.N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 4471-4473 (1996)

- Saif, M.W., Karapanagiotou, L., Syrigos, K.: *World J. Gastroenterol.* 13(33), 4423-4430 (2007)
- Sandstrom, J., Nilsson, P., Karlsson, K., Marklund, S. L.: *J. Biol. Chem.* 269, 19163-19166 (1994)
- Shimoda-Matsubayashi, S., Matsumine, H., Kobayashi, T., Nakagawa-Hattori, Y., Shimizu, Y., Mizuno, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 561-565 (1996)
- Siegel, D., Anwar, A., Winski, S., Kepa, J.K., Ross, D.: *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 41, 227 (2000)
- Sims, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K., Hewer, A.: *Nature* 252, 326-328 (1974)
- Slyskova, J., Dusinska, M., Kuricova, M., Soucek, P., Vodickova, L., Susova, S., Naccarati, A., Tulupova, E., Vodicka, P.: *Mutat. Res. (v tisku)*, (2007)
- Somorovská, M., Jahnová, E., Tulinská, J., Zámečnicková, M., Šarmanová, J., Terenová, A.: *Mutat. Res.* 428, 255-269 (1999)
- Spurdle, A.B., Chang, J., Byrnes, G., Chen, X., Dite, G., McCredie, M., Giles, G., Southey, M., Chenevix-Trench, G., Hopper, J.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16(4), 769-774 (2007)
- Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chem. listy* 93, 229-237 (1999)
- Stiborova, M., Rupertova, M., Aimova, D., Ryslava, H., Frei, E.: *Toxicology* 236, 50-60 (2007)
- Strange, R.C., Spiteri, M.A., Ramachandran, S., Fryer, A.A.: *Mutat. Res.* 482(1-2), 21-26 (2001)
- Sugimura, H., Caporaso, N.E., Shaw, G.L.: *Carcinogenesis* 11, 1527-1530 (1990)
- Sumner, S.J., Fennel, T.R.: *Crit. Rev. Toxicol.* 24, S11-33 (1994)
- Šarmanová, J., Šůsová, S., Gut, I., Mrhalová, M., Kodet, R., Adámek, J., Roth, Z., Souček, P.: *Eur. J. Hum. Genet.* 12, 848-854 (2004)
- Šarmanová, J., Týnková, L., Šůsová, S., Gut, I., Souček, P.: *Pharmacogenetics* 10, 781-788 (2000)
- Štípek, S.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*, Grada, Praha (2000)
- Teixeira, J.P., Gaspar, J., Roma-Torres, J., Silva, S., Costa, C., Roach, J., Mayan, O., Rueff, J., Farmer, P.B.: *Toxicology* 237, 58-64 (2007)
- Teixeira, J.P., Gaspar, J., Silva, S., Torres, J., Silva, S.N., Azevedo, M.C., Neves, P., Laffon, B., Mendez, J., Goncalves, C., Mayan, O., Farmer, P.B., Rueff, J.: *Toxicology* 195, 231-42 (2004)

- Teixeira, J.P., Torres, S.S., Gaspar, J., Roach, J., Farmer, P.B., Rueff, J., Mayan, O.: *Int. J. Hyg. Environ. Health* 211, 59-62 (2008)
- To-Figueras, J., Gene, M., Gomez-Catalan, J., Pique, E., Borrego, N., Corbella, J.: *Cancer Lett.* 173, 155-162 (2002)
- Toruner, G.A., Akyerli, C., Ucar, A.: *Arch. Toxicol.* 75, 459-464 (2001)
- Traver, R.D., Siegel, D., Beall, H.D., Phillips, R.M., Gibbon, N.W., Franklin, W.A., Ross, D.: *Br. J. Cancer.* 75, 69-75 (1997)
- Trna, J., Dítě, P., Hermanová, M., Ševčíková, A.: *Čes. a Slov. Gastroent. a Hepatol.* 62(2), 69-73 (2008)
- ÚZIS: Novotvary ČR 2003, ÚZIS a NOR ČR, Praha (2003)
- Vella, F., Ferry, G., Delagrange, P., Boutin, J.A.: *Biochem. Pharmacol.* 71, 1-12 (2005)
- Vineis, P., Malats, N., Lang, M., d'Errico, A., Caporaso, N., Cuzick, J., Boffetta, P., IARC Scientific Publication 148, (1999)
- Vodicka, P., Koskinen, M., Arand, M., Oesch, F., Hemminki, K.: *Mutat. Res.* 511, 239-254 (2002)
- Vodicka, P., Koskinen, M., Stetina, R., Soucek, P., Vodickova, L., Matousu, Z., Kuricova, M., Hemminki, K.: *Cancer Detect. Prev.* 27: 275-284 (2003)
- Vodicka, P., Soucek, P., Tates, A.D., Dusinska, M., Sarmanova, J., Zamecnikova, M.: *Mutat. Res.* 482, 91-105 (2001)
- Vodicka, P., Tuimala, J., Stetina, R., Kumar, R., Manini, P., Naccarati, A., Maestri, L., Vodickova, L., a spol.: *Environ. Health Perspect.* 112, 867-871 (2004)
- Vodicka, P., Tvrđik, T., Osterman-Golkar, S., Vodickova, L., Peterkova, K., Soucek, P.: *Mutat. Res.* 445, 205-224 (1999)
- Vodička, P., Koskinen, M., Naccarati, A., Oesch-Bartlomowicz, B., Vodičková, L., Hemminki, K., Oesch, F.: *Drug Metab. Rev.* 38(4), 805-53 (2006)
- Vrána, D.: osobní sdělení
- Wang, J., Deng, Y., Cheng, J., Ding, J., Tokudome, S.: *Cancer Lett.* 201, 185-193 (2003)
- Wang, L.I., Miller, D.P., Sai, Y., Liu, G., Su, L., Wai, J.C., Lynch, T.J., Christiani, D.C.: *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1818-21 (2001)

Watabe, T., Ozawa, N., Yoshikawa K.: *J. Pharm. Dyn.* 5, 129-133 (1982)

Weydert, Ch., Roling, B., Liu, J., Hinkhouse, M., Ritchie, J., Oberley, L., Cullen, J.: *Mol. Cancer Ther.* 2, 361-369 (2003)

Wheatley-Price, P., Asomaning, K., Reid, A., Zhai, R., Su, L., Zhou, W., Zhu, A., Ryan, D., Christiani, D.C., Liu, G.: *Cancer* 112, 1037-1042 (2008).

Whitcomb, D.C., Pogue-Geile, K.: *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 31, 663-678 (2002)

Woodson, K., Tangrea, J.A., Lehman, T.A.: *Cancer Causes Control.* 14, 513-518 (2003)

Wormhoudt, L.W., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P.: *Crit. Rev. Toxicol.* 29(1), 59-124 (1999)

Xu, S., Wang, Y., Roe, B., Pearson, W.R.: *J. Biol. Chem.* 273 (6), 3517-3527 (1998)

Yang, J.Q., Li, S., Huang, Y., Zhang, H.J., Domann, F.V., Buettner, G.R., Oberley, L.W.: *Antioxid. Redox Signal.* 3, 697-709 (2001)

Zhong, S., Wolf, C.R., Spurr, N.K.: *Hum. Genet.* 90(4), 435-439 (1992)

Zhou, W., Thurston, S.W., Liu, G., Xu, L.L., Miller, D., Wain, J., Lynch, T., Su, L., Christiani, D.: *Cancer Epidemiol.* 10, 461-466 (2001)

www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/ (13.6.2008)

web.vscht.cz/spiwokv/enzymologie/SOD (16.7.2008)

www.cancer.org (22.8.2008)

SVOLENÍ K ZAPŮJČENÍ

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka