

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY  
Katedra biochemie



**STUDIUM VZTAHU GENETICKÝCH POLYMORFISMŮ  
BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ A FREKVENCE  
VÝSKYTU CHROMOSOMÁLNÍCH ABERACÍ U OBECNÉ  
POPULACE**

Lenka Grosová

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



Praha 2006

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233217250

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavla Součka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Pavlu Součkovi, CSc. za odborné vedení a trpělivost při vypracování této práce, dále kolektivu skupiny biotransformací SZÚ v čele s MuDr. Ivanem Gutem, DrSc. za pomoc při experimentální práci a teoretickém přehledu zkoumané problematiky a . MUDr. Ludovítu Mušákovi, PhD (Martin) a MUDr. Marii Dušínské, CSc. (Bratislava) za souhlas s použitím vzorků genetického materiálu a dat. Zároveň děkuji pracovníkům Oddělení lékařské biologie, Jesseniovy lékařské fakulty v Martině a Státního zdravotního ústavu v Bratislavě za poskytnutí vzorků, informací z dotazníků účastníků studie a výsledků analýz frekvencí chromosomálních aberací. Studie byla provedena s podporou grantů: Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR, IGA č.: 8563-5, Grantové agentury ČR, GAČR č.: 310/05/2626 a 6 rámcového programu EU, č.: FOOD-CT-2003-505609.

Obsah.	Str.
1.Úvod	1
2.Teoretická část	2
2.1.Rakovina	2
2.2.Onkogeny	2
2.3.Tumor supresorové geny	2
2.4.Geny kódující opravné systémy	3
2.5.Biotransformační enzymy	3
2.5.1.Cytochromy P450	4
2.6.Genotoxické působení sloučenin	18
2.6.1.1,3-butadien	18
2.6.2.DNA adukty	21
2.6.3.Hemoglobinové adukty	22
2.6.4.Styren	24
2.6.5.Strukturní chromosomální aberace	27
3.Cíle diplomové práce	30
4.Metodika práce	31
4.1.Charakteristika sledovaného souboru	31
4.2.Souhlas etické komise	32
4.3.Analýza chromosomálních aberací	32
4.4.Izolace DNA z krve	33
4.5.Genotypování	34
4.5.1.Obecná charakteristika genotypování	34
4.5.2.PCR	34
4.5.3.Restrikční analýzy fragmentů	36
4.5.4.Podrobné podmínky analýzy	37
5.Výsledky	43
5.1.Statistické analýzy	43
5.2.Porovnání studované populace	43
5.3.Výsledky analýz	46
6.Diskuse	52
7.Závěr	58
8.Přílohy	59
9.Seznam použité literatury	71

## 1. ÚVOD

Biotransformační enzymy jsou enzymy, které odpovídají za detoxikaci a exkreci cizorodých látek (xenobiotik). Řada biotransformačních enzymů je v populaci polymorfní. Jako polymorfismus se označuje přítomnost určité změny v genu (bodová mutace, inserce, delece) u minimálně 1% populace.

Karcinogeneze je vícestupňový proces, při kterém dochází ke změně normálního buněčného růstu a diferenciaci. Je vyvolávána řadou faktorů. Jedná se o faktory fyzikální, biologické a také chemické. Mezi fyzikální faktory lze zařadit např. vliv UV záření (karcinomy kůže), působení rentgenového záření nebo expozici při práci s izotopy ( $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$ ). S izotopy se setkáváme i v přírodě, jde například o I, Po a Sr. Jako faktory biologické lze uvést působení onkovirů na lidskou genetickou informaci. Chemické faktory jsou např. polutanty životního prostředí, ale také látky, které jsou endogenního původu a jsou tudíž produkty našeho vlastního organismu (např. některé steroidní hormony). Karcinogeneze může být též vyvolána cizorodými genotoxickými látkami. Většina karcinogenních procesů je však zapříčiněna faktory životního prostředí, jde hlavně o vliv stravovacích návyků, kouření a stresu. Opomenout nelze ani expozici v povolání.

Karcinogeny jsou v lidském organismu metabolizovány. Dochází k jejich detoxikaci a následné exkreci z organismu, nebo k tvorbě reaktivních intermediátů.

Polymorfismům biotransformačních enzymů se dnes věnuje řada studií. Zabývají se především hledání genotypů a kombinací genotypů, které se častěji vyskytují u pacientů než u kontrolních skupin. Odhad rizika vzniku onemocnění je přesnější, bere-li se v úvahu více biotransformačních enzymů. Nejlepší je uvažovat enzymy I. i II. fáze biotransformace zároveň. Často diskutovaným problémem je porucha detoxikace, ke které dochází např. v případě, že je enzym I. fáze biotransformace aktivnější než enzym II. fáze biotransformace. Výsledným efektem takovéto poruchy může být vznik většího množství reaktivních intermediátů a jejich pomalejší odstraňování z organismu.

Studium polymorfismů v genech biotransformačních enzymů může přispět k diagnostice nádorového růstu a k posuzování individuální citlivosti vůči působení karcinogenů a kontaminant životního prostředí. Díky znalosti individuální citlivosti by mohlo dojít ke zlepšení možnosti odhadu jednotlivých zdravotních rizik při styku jednotlivce s různými polutanty a chemickými látkami.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Rakovina

Rakovina je genetické onemocnění, které vzniká následkem patologických změn v molekule DNA. V současnosti je přijímanou teorií tzv. teorie mechanismu buněčné transformace. Rozhodující roli zde hraje aktivace onkogenů a inaktivace tumor supresorových genů na základě genetických změn. Mutace DNA jsou nevyhnutelné a dochází k nim spontánně s frekvencí  $10^{-6}$  mutací na gen na buněčné dělení. Tato hodnota je dána přesností replikace DNA a jejích oprav. V průběhu života se v lidském těle odehraje asi  $10^{16}$  buněčných dělení, takže k mutaci dojde přibližně v  $10^{10}$  případech u každého lidského jedince. K přeměně normální buňky na rakovinnou je třeba více než jedné mutace. Obvykle je třeba alespoň pěti nebo šesti nezávislých mutací, které vyřadí regulační geny v buňce, aby se tato stala nádorovou.

Úzký vztah k nádorovým onemocněním mají onkogeny, tumor supresorové geny a geny regulující dělení buňky a geny opravy DNA.

### 2.2. Onkogeny

Buněčné onkogeny vznikají z normálních genů, tzv. protoonkogenů. Tyto za normálních fyziologických okolností pozitivně stimulují růst, proliferaci a diferenciaci buňky. Mutací protoonkogenů však vznikají tzv. onkogeny, které produkují proteiny (onkoproteiny). Tyto onkoproteiny si sice zachovávají svou základní funkci, ale jsou buď produkovány v nadměrném množství, nebo mají zvýšenou aktivitu. K nadměrné buněčné proliferaci může dojít již po mutaci jedné alely. Mezi známé onkogeny patří např. geny ze skupiny *ras*.

### 2.3. Tumor supresorové geny (antionkogeny)

Tumor supresorové geny (TSG) kódují proteiny, které za normálních okolností potlačují buněčnou transformaci a proliferaci. Mutace inaktivující TSG proto způsobují nadměrnou buněčnou proliferaci. Ke ztrátě kontroly nad buněčnou proliferací musí být ztraceny nebo inaktivovány obě alely TSG, které jsou obsaženy v diploidní buňce, jedna funkční alela zpravidla postačuje pro normální regulaci buněčného cyklu. Inaktivace TSG může být způsobena mutací, hypermethylací nebo ztrátou heterozygoty (přítomnost pouze jedné alely genu). Mezi nejznámější TSG patří např. *p53*.

## 2.4. Geny kódující opravné systémy (reparační geny)

Reparační geny jsou geny kódující proteiny, které opravují chyby vznikající v průběhu replikace nebo mutace vznikající vlivem např: chemických látek. Tyto geny mají spíše pasivní roli v regulaci růstu, ale jejich porucha usnadňuje maligní transformaci.

## 2.5. Biotransformační enzymy

S biotransformačními enzymy se setkáváme u prokaryot i eukaryot. Běžně je nacházíme v řadě tkání, např. v játrech, plicích nebo ledvinách. Tyto enzymy zodpovídají za detoxikaci a exkreci cizorodých látek (xenobiotik) i endogenních látek (např: hormony, vitamíny) z organismu. Mezi xenobiotika řadíme léky, rostlinné metabolity a polutanty životního prostředí. Většinou jde o látky nepolárního charakteru, které jsou snadno rozpustné v tucích. Hlavní role biotransformačních enzymů spočívá v převádění těchto chemických látek na produkty rozpustné ve vodě, které jsou snáze odstraňovány z organismu. Biotransformační enzymy ovšem nekatalyzují pouze detoxikační reakce, někdy dochází k tvorbě reaktivních intermediátů, které poté mohou reagovat s makromolekulami (DNA, RNA, proteiny, lipidy) a vázat se na ně. Touto vazbou může dojít k nevratnému poškození těchto makromolekul a ke změně funkce u proteinů nebo k mutacím u nukleových kyselin

Biotransformační reakce se uskutečňují ve dvou fázích. I. fáze je tzv. funkční a II. fáze je konjugací. Enzymy I. fáze biotransformace vnášejí funkční skupinu (např. OH) do molekuly substrátu a enzymy II. fáze biotransformace pak tuto funkční skupinu používají pro konjugaci (např. s glutathionem, kyselinou glukuronovou, sulfátem, glukosou nebo cysteinem) a tvoří tak hydrofilní produkty.

Řada genů biotransformačních enzymů je v populaci polymorfních, u některých existují inaktivující alely. Frekvence jednotlivých polymorfismů se často výrazně liší mezi jednotlivými populacemi -např. mezi bělochy a asiaty. Polymorfní místo může mít různou polohu. Může se nacházet v kódující oblasti genu (exonu) , což může vést ke změně aminokyselinové sekvence v proteinu, a tím ke změně aktivity. Toto místo se může nacházet také v nekódujících oblastech (introny, 5' nebo 3' přiléhající oblasti), kde může mít za následek změnu regulace exprese genu (ovlivnění transkripce) nebo sestřihu vytvořené mRNA (viz. tabulka č.1). Tyto změny mohou také ovlivnit inducibilitu (odpověď na

přítomnost substrátu v buňce) nebo afinitu enzymu (schopnost vázat substrát). Právě změna aktivity, afinity nebo inducibility biotransformačních enzymů způsobená přítomností polymorfismů může mít vliv na metabolismus jedince a může ovlivňovat detoxikaci xenobiotik či aktivaci prokarcinogenů.

### 2.5.1. CYTOCHROMY P450

Cytochromy P450 (dále jen CYP) jsou enzymy, které v organismu zodpovídají především za reakce I. fáze biotransformace chemických látek, vedoucích k jejich detoxikaci a po reakcích II. fáze biotransformace též k jejich eliminaci z buněk a k exkreci z organismu. Tyto enzymy katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce, které jsou začleněné do metabolické transformace léčiv, polutantů, ale i endogenních látek (mastné kyseliny, prostaglandiny, steroidy).

CYP jsou nejpočetnější enzymy, které jsou zodpovědné za metabolismus léčiv. Mají také nejširší rozsah substrátové specifity.

CYP se vyskytují v různých formách (izoenzymech, izoformách), které jsou řazeny do různých rodin a podrodin dle míry (stupně) homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) proteinových molekul. Do stejné rodiny náleží CYP, u kterých byla nalezena více než 40% homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů, do stejné podrodiny poté ty, které vykazují homologii více než 60%. Zjednodušení označení cytochromů P450 pochází z nového systematického názvosloví: CYtochrome P450 [Nebert a kol., 1989 a 1991].

Exprese genů CYP je regulována pomocí tří mechanismů:

- 1) aktivace transkripce (nejčastější způsob)
- 2) stabilizace mRNA (např. u CYP2E1)
- 3) stabilizace hotového proteinu (např. ethanolom)

Dle předpokladů existovalo na počátku (před 2-3 miliardami let) jen málo genů, které kódovaly jednotlivé formy CYP. Později (asi před 800 miliony let) došlo k extrémnímu zmnožení forem CYP vlivem tzv. „souboje rostlin a živočichů“. Jejich koexistence totiž vyvolala potřebu vzniku ochranných mechanismů, kterými se rostliny bránily před živočichy,



Tabulka č.1 : Přehled polymorfních alel některých genů

Gen	Polymorfismus	Alely	Poloha varianty	Záměna báze	Záměna aminokyseliny	Vliv polymorfismu	Citace
<b>CYP1B1</b>	-	*1/*2	exon 2, kodon 48	C→G	Arg→Gly	zvýšení aktivity	Stoilov a kol., 1998
	-	*1/*2	exon 2, kodon 119	G→T	Ala→Ser	zvýšení aktivity	
	OliI	*1/*3	exon 3, kodon 432	C→G	Leu→Val	zvýšení aktivity	
	MwoI	*1/*4	exon 3, kodon 453	A→G	Asn→Ser	zvýšení aktivity	
<b>CYP2E1</b>	RsaI	*1/*5B	-1019, 5' příl. oblast	C→T	-	není jasný	Watanabe a kol., 1990
	PstI	*1/*5B	-1259, 5' příl. oblast	G→C	-	není jasný	Persson a kol., 1993
	DraI	*1/*6	7668, intron 6	T→A	-	není jasný	
<b>EPHX1</b>	EcoRV	*1/*3	exon 3, 337	T→C	Tyr→His	50% aktivita	Hasset a kol., 1994
	RsaI	*1/*4	exon 4, 415	A→G	His→Arg	125% aktivita	
<b>NQO1</b>	HinfI	*1/*2	exon 6, 187	C→T	Pro→Ser	ztráta funkce	Traver a kol., 1997
<b>GSTM1</b>	delece genu	null	-	-	-	ztráta funkce	Board a kol., 1981
<b>GSTM3</b>	EamI	*A/*B	intron 6	del 3bp	-	není jasný	Inskip a kol., 1995
<b>GSTP1</b>	BsmAI	*1/*2	exon 5, kodon 105	A→G	Ile→Val	vyšší aktivita a afinita pro elektrofilní substráty	Zimniak a kol., 1997
<b>GSTT1</b>	delece genu	null	-	-	-	ztráta funkce	Pemble a kol., 1994

kteří vyhledávali rostlinnou potravu. Rostliny začaly produkovat různé fytotoxiny a fytoalexiny, na jejichž velké množství reagovali živočichové zmnožením svých CYP [Šarmanová, diplom. práce, 1999].

CYP se v lidském organismu vyskytují v celé řadě tkání jako jsou ledviny, plíce, kůže, gastrointestinální trakt (GIT) a močové cesty. Velké množství CYP lze ovšem nalézt v játrech (jaterních mikrosomech). Jejich průměrný obsah zde je asi 0,344 nmol/mg proteinu. Hlavní enzymy P450 jsou uvedeny v tabulce č. 2. Korelace mezi množstvím enzymu a věkem či pohlavím nebyla nalezena. Množství CYP v jednotlivých tkáních nelze brát absolutně, jelikož jejich obsah značně závisí na mnoha faktorech jako je např. genetický polymorfismus, vliv polutantů, výživa, kouření či konzumace alkoholu. CYP jsou enzymy jak konstitutivní (existuje stálá hladina závislá na fyziologických faktorech), tak inducibilní, jejichž hladinu lze několikanásobně zvýšit podáním induktoru. Jednotlivé induktory CYP jsou uvedeny v tabulce č. 3.

**Tabulka č.2: Obsah cytochromů P450 v lidských játrech**

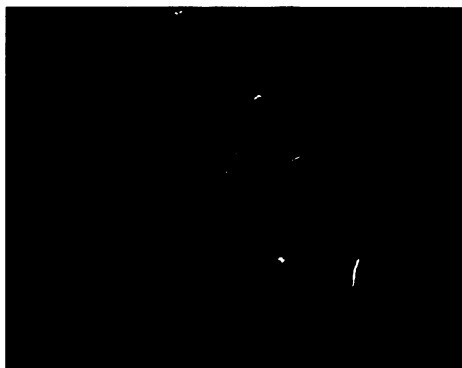
P450	%z celkového P450
1A2	13,0
1B1	1,0
2A6	4,0
2B6	0,2
2C	18,0
2D6	2,5
2E1	7,0
3A4	28,0

**Tabulka č.3: Cytochromy P450 a jejich induktory**

P450	Induktor
1A1	Tetrachlordibenzo-p-dioxin(TCDD)
1A2	TCDD, kouření
2A6	Kouření
2B6	Barbituráty, dexamethason
2C	Barbituráty, dexamethason
2D6	Barbituráty, ethanol
2E1	Ethanol, hladovění, isoniazid
3A4	Barbituráty, dexamethason, rifampicin

### 2.5.1.1.CYP1B1

#### Obr.1 3D struktura CYP1B1



CYP1B1 byl poprvé izolován a charakterizován v roce 1994 [Sutter a kol., 1994]. V roce 1996 byl lokalizován na chromosomu 2 do oblasti 2p21-p22 [Tang a kol., 1996]. Gen o velikosti 8,5 kbp je tvořen třemi exony, z čehož jsou kódující pouze dva, které tvoří mRNA dlouhou 5,1 kbp. Translací vzniká protein o velikosti 544 aminokyselin. CYP1B1 je regulován transkripčním

faktorem AhR (aromatic hydrocarbon receptor). V CYP1B1 bylo nalezeno několik polymorfismů. Intron 1 obsahuje polymorfni místo v nukleotidu 13, dochází zde ke změně C→ T. V exonu 2 jsou obsažena dvě polymorfni místa, v kodonech 48 a 119, a v exonu 3 jsou tato místa tři, v kodonech 432, 449 a 453. Čtyři z těchto polymorfismů vedou k záměně aminokyselin. V kodonu 48 (Arg→ Gly), ve kodonu 119 (Ala→ Ser), v kodonu 432 (Leu→ Val) a v kodonu 453 (Asn→ Ser) [Stoilov a kol., 1998].

CYP1B1 je hojně exprimován v nádorových tkáních. Protein CYP1B1 svojí hydroxylasovou aktivitou metabolizuje 17β-estradiol na 4-hydroxyestradiol, což je endogenní karcinogen, u kterého se předpokládá vztah k rozvoji nádorového onemocnění prsu a dělohy [Tuominen a kol., 2003].

Frekvence variantní alely (CYP1B1\*3):

- 1) běloši 45% [Rylander-Rudquist a kol., 2003]
- 2) asiáté 16-18% [Sasaki a kol., 2004]

Frekvence variantní alely (CYP1B1\*4):

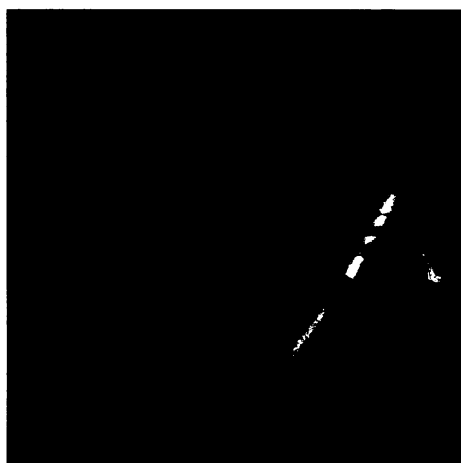
- 1) běloši 18% [Rylander-Rudquist a kol., 2003]
- 2) asiáté 14% [Liang a kol., 2005]

Studie uveřejněná v roce 2003 sledovala vztah mezi nádorovým onemocněním prsu a hormonální léčbou u žen po menopauze. Ženy, které užívaly hormonální preparáty déle než 4 roky a zároveň byly nositelkami 432Val/Val genotypu vykazovaly vyšší riziko vzniku nádorového onemocnění (OR=2,0; CI 1,1-3,5 ) v porovnání s ženami, které nebyly nositelkami tohoto genotypu [Rylander-Rudqvist a kol., 2003]. Další studie z roku 2004 byla

provedena na japonské populaci. Sledován byl vztah CYP1B1 k nádorovému onemocnění ledvin. Frekvence genotypu 432Val/Val byla významně vyšší u pacientů (12,3%) oproti kontrolám (6,5%) ( $P=0,001$ ). V této studii byl rovněž sledován polymorfismus v kodonu 453, ale všichni jedinci ze skupiny pacientů i kontrol byli nositeli 453Asn/Asn genotypu, takže nebyl zaznamenán žádný rozdíl v porovnání s dalšími genotypy [Sasaki a kol., 2004]. Studie publikovaná v roce 2005 sledovala nádorové onemocnění plic ve vztahu k CYP1B1. U kuřáků, kteří byli nositeli variantní alely bylo riziko vzniku onemocnění vyšší ( $OR=2,78$ ;  $CI\ 1,46-5,29$ ) než u jedinců bez této alely ( $OR=2,27$ ;  $1,33-3,87$ ) [Liang a kol., 2005].

### 2.5.1.2. CYP2E1

#### **Obr.2 3D struktura CYP2E1**



CYP2E1 je enzym, který je indukovatelný ethanolem a řadou dalších látek např: acetonem či fyziologických faktorů např. hladověním. U hlodavců (potkani, myši) je indukovatelný benzenem či toluenem. Mezi jeho známé inhibitory patří aminoacetonitril, disulfiram nebo diethyldithiokarbamat. V lidském organismu je jeho specifickým inhibítorem 4-methylpyrazol.

CYP2E1 metabolizuje hlavně malé a hydrofobní molekuly. Bylo nalezeno více než 100 specifických substrátů CYP2E1 [Terelius a kol., 1993]. Aktivuje kyslík na radikály a metabolicky aktivuje známé prokarcinogeny např: styren, butadien, benzen, vinylchlorid a nitrosaminy [Guengerich a kol., 1991].

CYP2E1 je dlouhý 11,7 kbp a je složen z devíti exonů. Translací mRNA o velikosti 1,6 kbp vzniká protein se 494 aminokyselinami. V genu CYP2E1 bylo popsáno několik polymorfních míst např: RsaI, DraI, TaqI.

Vyskytuje se hlavně v játrech, ledvinách a plicích.

#### **2.5.1.2.1. Polymorfismus DraI**

Tento polymorfismus leží v intronu 6, v poloze 7668. Dochází zde k transverzi  $T \rightarrow A$  [Uematsu a kol., 1991]. Alely jsou označeny \*1 a \*6.

Frekvence variantní alely (CYP2E1\*6):

1) běloši: 8-10% [Hirvonen a kol., 1993; Person a kol., 1993; Matthias a kol., 1998]

2) asiáté: 21-31% [Uematsu a kol., 1991; Kato a kol., 1994; Hildesheim a kol., 1995; Yu a kol., 1995]

3) černoši: 9% [Kato a kol., 1994]

Studie uveřejněná ve Švédsku neprokázala na výrazný rozdíl v distribuci \*1 alely mezi skupinou pacientů a skupinou kontrol. Asi u 50% nositelů \*1 alely byla rovněž nalezena -1019 C→ T alela v 5' – přiléhající oblasti [Persson a kol., 1993].

V další studii [Wong a kol., 2000] se autoři zaměřili na vztah k onemocnění jater. Ani zde nebyly nalezeny výrazné rozdíly mezi frekvencí \*1 alely u kontrolní skupiny a u skupiny pacientů s cirhózou jater popř. s karcinomem jater.

#### **2.5.1.2.2. Polymorfismus RsaI**

Tento polymorfismus se nachází v 5' - přiléhající oblasti genu CYP2E1. Konkrétně leží v poloze -1019, kde dochází k tranzici C → T [Uematsu a kol., 1991]. U bělochů je tento polymorfismus v těsném vztahu k PstI polymorfismu. Ten se nachází v poloze -1259 a dochází u něj k transverzi G → C. U afrických Američanů a Číňanů nebyl vztah těchto polymorfismů potvrzen [Kato a kol., 1992]. Alely jsou označeny \*1 a \*5B.

Variantní alela \*5B má 10x vyšší transkripční aktivitu než alela \*1B [Hayashi a kol., 1991]. Díky vyšší aktivitě alely \*5B dochází k lepší toleranci alkoholu v důsledku jeho rychlejšího odbourávání [Iwahashi a kol., 1995].

Frekvence mutované alely \*5B (CYP2E1\*5B):

- 1) běloši: 2-10% [Pirmohamed a kol., 1995; Ladero a kol., 1996; London a kol., 1996; Brockmüller a kol., 1996; El-Zein a kol., 1997; Matthias a kol., 1998]
- 2) asiáté: 17-26% [Kato a kol., 1992; Tsutsumi a kol., 1994; Maezawa a kol., 1994; Yamauchi a kol., 1995; Yu a kol., 1995; Chao a kol., 1995; Hildesheim a kol., 1995]
- 3) Portorikánci: 15% [Wu a kol., 1997]
- 4) černoši: 2-7% [London a kol., 1996; Wu a kol., 1997]

Ve studii provedené ve Švédsku bylo uveřejněno zjištění, že mutovaná alela \*5B je mnohem méně frekventovaná u pacientů s nádorovým onemocněním plic. Na základě tohoto pozorování se předpokládá, že nositelé \*5B alely mají mnohem nižší riziko, že onemocní nádorem plic [Persson a kol., 1993].

V další studii se autoři zaměřili na vztah k cirhóze jater. Byla zde nalezena souvislost mezi vyšším výskytem \*5B alely a jaterní cirhózou. Frekvence alely \*5B byla výrazně vyšší u pacientů než u kontrol. [Tsutsumi a kol., 1994]. Stejný závěr byl publikován v britské studii [Pirmohamed a kol., 1995]. Další studie byla zaměřena na výzkum karcinomu jater. U pacientů, kteří pili více alkoholu než 80 g/den alespoň 5 x týdně, byl nalezen vyšší výskyt \*1/\*5B a \*5/\*5B genotypů (OR=3,0; CI 0,5-16,4), nežli u pacientů, kteří pili příležitostně (OR=1,2; CI 0,4-3,4). [Lee a kol., 1997]. Tato zjištění nebyla potvrzena v následující studii, kde naopak nebyl nalezen rozdíl ve frekvenci výskytu \*5B alely mezi skupinou pacientů s karcinomem jater a skupinou kontrolní [Wong a kol., 2000]. Studie zaměřená na vztah ke skvamóznímu typu karcinomu jícnu, byla publikována v Japonsku. Byl zde nalezen rozdíl ve frekvenci výskytu \*1/\*1B genotypu mezi pacienty (71 %) a kontrolami (44 %). U jedinců, kteří jsou nositeli tohoto genotypu bylo nalezeno výrazně vyšší riziko vzniku onemocnění (OR=3,2; CI 2,5-4,1) [Tan a kol., 2000].

V USA byla uveřejněna studie týkající se nádorových onemocnění ústní dutiny – zahrnuty zde byly např. nádory mandlí, ústní části hrtanu apod. Kontrolní skupina i skupina pacientů byla složena z bělochů a afrických Američanů. Výrazně vyšší frekvence \*1/\*5B genotypu byla zaznamenána u bělochů ve srovnání s africkými Američany v kontrolní skupině. Stejný rozdíl byl zaznamenán ve výskytu mutované \*5B alely. V této studii byl také zmíněn vyšší výskyt \*1/\*1B genotypu u pacientů v porovnání s kontrolami (P=0,033) [Liu a kol., 2001].

### 2.5.1.3. Mikrosomální epoxid hydrolasa 1 (EPHX1)

#### **Obr.3** 3D struktura EPHX1



Epoxid hydrolasy jsou řazeny mezi enzymy I. fáze biotransformace. Katalyzují přeměnu různých epoxidů, z nichž některé mohou být karcinogenní, na *trans*-dihydrodioly rozpustné ve vodě. Jde hlavně o detoxikační enzymy. Účastní se též metabolismu xenobiotik, jelikož navazují na metabolismus CYP. Přímo se účastní metabolismu styrenu. U těchto enzymů nebyla zjištěna genetická komplexita jako u jiných enzymů, které metabolizují xenobiotika (CYP, GST). Byly popsány dva typy epoxid hydrolas:

mikrosomální epoxid hydrolasa (mEH, EPHX1) a cytozolická (sEH, EPHX2). Epoxid

hydrolasy byly nalezeny především v játrech. Mnohem nižší hladina byla detekována v plicích a lymfocytech.

Gen je dlouhý 20,3 kbp, nachází se na chromosomu 1 a obsahuje devět exonů [Hasset a kol., 1994]. Osm z těchto exonů je kódujících. Transkripcí mRNA dlouhé 1,8 kbp vzniká protein o 456 aminokyselinách.

EPHX1 přeměňuje benzo(a)pyren 4, 5-oxid na benzo(a)pyren trans-4, 5-dihydrodiol, jenž je méně mutagenní. Účastní se též metabolismu styren 7,8-oxidu na styrenglykol.

Polymorfismus EPHX1 byl charakterizován Hassetem v roce 1994. Byla nalezena dvě polymorfnní místa v exonech 3 a 4. Obě tyto varianty mají vliv na enzymatickou aktivitu, ovlivňují též stabilitu a afinitu proteinu. Pokud jsou přítomny obě varianty, aktivita enzymu je normální [Hasset a kol., 1994]. Z tohoto důvodu je třeba sledovat oba polymorfismy a kombinací výsledků odhadnout předpokládanou aktivitu enzymu [Benhamou a kol. 1998].

#### **2.5.1.3.1. Polymorfismus v exonu 3**

V exonu 3 dochází v poloze 337 k tranzici T → C a tím k záměně tyrosinu na na histidin. Enzymatická aktivita variantní formy je redukována na polovinu [Hasset a kol., 1994; Brockmöller a kol., 1996; Smith a kol., 1997].

Frekvence variantní alely (EPHX1\*3):

- 1) běloši: 31-52 %
- 2) černoši: 17-20 % [Masimirembwa a kol., 1998]
- 3) asiáté (Číňané) : 54 % [Hasset a kol., 1994; McGlynn a kol., 1995]

#### **2.5.1.3.2. Polymorfismus v exonu 4**

V exonu 4 dochází k tranzici A → G v poloze 415. Tím dochází ke změně histidinu na arginin v kodonu 139. Enzymatická aktivita variantní formy vzrůstá o 25 % [Hasset a kol., 1994].

Frekvence variantní alely (EPHX1\*4)

- 1) běloši: 15 – 36 % [Hasset a kol., 1994; Brockmöller a kol., 1996; Smith a kol., 1997]
- 2) černoši: 26 -30 % [Masimirembwa a kol., 1998]

Studie uveřejněná v roce 2002 v Austrálii neprokázala asociaci mezi polymorfismy v exonech 3 a 4 k nádorovému onemocnění vaječníků. Bylo zde nalezeno téměř stejné

zastoupení variantních homozygotů a heterozygotů u pacientů i u kontrol [Baxter a kol., 2002].

Další studie byla zaměřena na výzkum kombinace genotypů GSTM1 a EPHX1. Závěrem této studie byl poznatek, že vysoká aktivita EPHX1 byla spojena s rostoucím rizikem vzniku nádoru hrtanu u bělochů s GSTM1 – null genotypem, ale ne u nositelů GSTM1 –plus genotypu [Park a kol., 2003].

Autoři následujících studií se zaměřili na vztah EPHX1 k nádorovému onemocnění plic. Ve studii uveřejněné v USA byl zmíněn předpoklad, že vysoká aktivita enzymu EPHX1 je spojena se vzrůstem rizika vzniku nádoru plic [Cajas-Salazar a kol., 2003]. Studie provedená o rok později prokázala provázanost polymorfismu v exonu 4 a kouřením u mužů a také souvislost mezi polymorfismem v exonu 3 a kouřením u žen. U žen vzrůstá riziko vzniku kolorektálního adenomu především u skupiny, která byla při genotypování označena jako skupina normálních homozygotů a taktéž u skupiny, kde byla spotřeba balíčků za rok mnohem vyšší než 25, vzhledem k nekuřačkám. Naproti tomu stejná souvislost nebyla prokázána u kontrolních skupin mužů [Trama a kol., 2004].

#### 2.5.1.4. Glutathion S-transferasy (GST)

##### **Obr.4** 3D struktura GST třídy $\omega$



GST patří mezi enzymy II. fáze biotransformace. Dohromady vytvářejí rozsáhlou rodinu enzymů, která katalyzuje konjugaci řady hydrofobních a elektrofilních molekul s glutathionem ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycin). Většinou se jedná o reakce detoxikačního charakteru. Hydrofobní látky jsou přeměňovány na kyselinu merkapturovou, a z organismu jsou vylučovány v moči. Detoxikační reakce obvykle předcházejí vzniku nádorového onemocnění, jelikož zabraňují vazbě karcinogenů na

DNA. Na druhé straně některé molekuly po konjugaci s glutathionem získávají karcinogenní charakter. Mezi vedlejší účinky GST patří inaktivace cytostatik, které se užívají v protinádorové chemoterapii [Wormhoudt a kol., 1999].

GST obsahují chirální centrum, které rozpoznává stereoizomery- což znamená, že GST jsou opticky stereoselektivní. Každá podjednotka GST má aktivní centrum, které



obsahuje tzv. G- a H- místa, jde o vazebná místa pro glutathion a pro elektrofilní substrát.

Společným substrátem GST je 1-chloro-2, 4-dinitrobenzen.

Různé formy GST je možné najít v různých tkáních. Výskyt jednotlivých forem se také mění v závislosti na vývinu jedince. Některé formy GST lze najít ve vysokých hladinách v nádorových buňkách.

Jednotlivé isoenzymy byly nejprve rozděleny do osmi tříd- na cytosolické a mikrosomální. Savčí cytosolické GST byly rozděleny do tříd  $\alpha$  (GSTA),  $\mu$  (GSTM),  $\pi$  (GSTP),  $\kappa$  (GSTK),  $\omega$  (GSTO),  $\theta$  (GSTT),  $\sigma$  (GSTS) a  $\zeta$  (GSTZ) [Strange a kol., 2001].

#### 2.5.1.4.1. GSTM1

U této třídy GST byl poprvé detekován polymorfismus [Board a kol., 1981]. K detekci bylo využito elektroforetické analýzy lidského jaterního extraktu. Přibližně 40 % jedinců neexprimovalo detekovatelnou aktivitu. Jedince s delecí genu GSTM1 označujeme jako GSTM1-null a jedince, kteří tento gen exprimují jako GSTM1-plus.

V několika studiích byla nulová alela detekována u leukocytů pomocí substrátu *trans*-stilben oxidu [Seidegard a kol., 1985]. V současné době se ke stanovení používá PCR.

Gen GSTM1 se nachází na chromozomu 1, konkrétně leží na jeho krátkém rameni, je dlouhý přibližně 5,9 kbp. Obsahuje 8 exonů [Zhong a kol., 1992]. mRNA o velikosti 1,1 kbp kóduje protein tvořený 219 aminosylinami.

Dosud bylo popsáno pět podrodin GSTM které jsou lokalizovány velmi blízko sebe v oblasti veliké asi 20 kbp. Pořadí jednotlivých podrodin je: GSTM4 –GSTM2 –GSTM1, GSTM5 – GSTM3 [Xu a kol.,1998]. Vlivem nerovnoměrného crossing-overu mezi dvěma repetitivními oblastmi dochází k delecí o velikosti 15 kbp, která zahrnuje GSTM1 [Xu a kol., 1998]. Tato delece je velmi častá. GSTM1 je nejvíce exprimována v játrech [Hayes a kol., 2000].

Frekvence delece GSTM1:

- 1) běloši: 40-60 % [Seidegard a kol., 1988; Hirvonen a kol., 1993; Zhong a kol., 1993; Brockmüller a kol., 1994; Matthias a kol., 1998]
- 2) černoši: 22-35 % [Masimirembwa a kol., 1998; London a kol., 1995; Chen a kol., 1996]
- 3) asiáté : 40 - 60 % [Nakachi a kol., 1993; Kihara a kol., 1994; Katoh a kol., 1995 a 1996; Yu a kol., 1995]

#### 2.5.1.4.2. GSTP1

Gen GSTP1 je dlouhý 2,8 kbp a nachází se na chromosomu 11. Obsahuje sedm exonů [Cowell a kol., 1988]. V roce 1987 byla izolována cDNA GSTP1 [Kano a kol., 1987]. Protein tvořený 211 aminokyselinami vzniká translací mRNA o velikosti 700 bp. GSTP1 je extrahepatální enzym, který je nejvíce exprimován v mozkové tkáni [Hayes and Strange , 2000].

V genu GSTP1 bylo nalezeno polymorfní místo v exonu 5, v poloze 313. Dochází zde k tranzici A→G, čímž dochází ke změně isoleucinu na valin v kodonu 105 výsledného proteinu [Ahmad a kol., 1990]. Varianta se nachází v aktivním místě enzymu. Varianta s valinem má nižší aktivitu a afinitu pro elektrofilní substráty [Ali-Osman a kol., 1997]. Alely jsou označovány GSTP1\*1 a GSTP1\*2.

Frekvence varianty Val v kodonu 105:

- 1) běloši: 27-34 % [Harries a kol., 1997; Ryberg a kol., 1997; Matthias a kol., 1998]
- 2) původní australský obyvatel: 11 % [Hartus a kol., 1998]
- 3) asiáté : 19 % [Hartus a kol., 1998]

#### 2.5.1.4.3. GSTT1

GSTT1 je hlavním enzymem zajišťujícím metabolismus mono- a dihalomethanu. Dále se účastní metabolismu ethylen oxidu, mono – a diepoxybutanu. Na rozdíl od ostatních GST nemetabolizuje 1 – chloro – 2, 4 – dinitrobenzen [Meyer a kol., 1991].

Gen GSTT1 se nachází na dlouhém rameni chromozomu 22. Je dlouhý 8,1 kbp. Translací mRNA dlouhé 1,0 kbp vzniká protein tvořený 241 aminokyselinami [Pemble a kol., 1994]. Nejvyšší exprese GSTT1 je v ledvinách a játrech [Hayes a kol., 2000].

Frekvence delece genu GSTT1:

- 1) běloši: 10-20 % [Warholm a kol., 1994; Trizna a kol., 1995; Kempkes a kol., 1996, Elxpuru – Camigura a kol..1996]
- 2) černoši: 20-26 % [Masimirembwa a kol., 1998]
- 3) asiáté : 38 - 64 % [Lee a kol., 1995].

Studie provedená v roce 1997 v Japonsku na skupině tvořené z 158 pacientů a 174 kontrol prokázala, častější výskyt genotypu GSTM1-null u pacientů, kteří byli kuřáci (56,7%) než-li u pacientů, kteří nekouřili (43,3%). U kuřáků rostla frekvence genotypu GSTM1-null u nádorového onemocnění dutiny ústní, ale u nádoru hrtanu nebyla tato frekvence výrazně vyšší (OR=1,77; CI 1,04-3,01). U pacientů s nádorem hrtanu byla

frekvence genu GSTM1-null vyšší u skupiny pod 60 let (78,6%) než u starších nad 60 let života (36,8%) ( $P=0,03$ ). Z těchto údajů vyplývá, že polymorfismus genu GSTM1 je modulován věkem a kouřením. Vliv má také odlišnost různých typů nádorového onemocnění [Kihara a kol., 1997]. Další studie provedená v Texasu v USA prokázala souvislost s polymorfismem GSTM1-null a vznikem nádorového onemocnění plic, močového měchýře a žaludku. Nádory tohoto typu patrně souvisí s vlivem GSTM1 na metabolismus enviromentálních polutantů [Trizna a kol., 1995]. V roce 1995 byla provedena studie u obyvatel Číny a Ghany, prokázala vliv GSTM1 na vznik nádoru jater. GSTM1 se totiž účastní metabolismu mykotoxinu Aflatoxinu B1 v jaterních buňkách [McGlynn a kol., 1995]. Wen Tan provedl v Číně v roce 2000 studii, která potvrdila vztah mezi polymorfismy GSTM1 a nádorovými onemocněními hrtanu, plic, krku a hlavy.

Byla prokázána výrazně vyšší frekvence GSTM1-plus u pacientů (70%) než-li u kontrol (49,3%) ( $P<0,001$ ). V této studii byl rovněž zmíněn synergismus mezi GSTM1 a CYP2E1. U jedinců, kteří byli nositeli kombinace CYP2E1 \*1B/\*1B a GSTM1-null bylo  $OR=4,4$  (CI 1,8-10,8). U kombinace CYP2E1 \*1B/\*1B a GSTM1-plus bylo  $OR=8,5$  (CI 3,7-19,9) [Wen Tan a kol., 2000]. Studie provedená v Polsku v roce 2005 poukazuje na vyšší frekvenci kombinace genotypů GSTM1-null a NAT2 \*4/\*6A u pacientů s nádorovým onemocněním hrtanu (13,8%) než u kontrol (6,0%) ( $P=0,001$ ). GSTM1 polymorfismus v kombinaci s jinými geny např. CYP1A1 neprokázal výrazný rozdíl ve frekvencích u pacientů a kontrol. Stejný závěr byl učiněn u kombinace polymorfismu GSTM1 s GSTT1 [Gajecka a kol., 2005]. V roce 2001 byla ve Finsku provedena studie zabývající se rolí polymorfismu GSTM1 v nádorovém onemocnění prsu. Výrazná korelace byla nalezena mezi genotypem GSTM1-null a rizikem vzniku nádoru prsu u žen po menopauze ( $OR=1,49$ ; CI 1,03-2,15) [Mitrunen a kol., 2001]. Další studie sledovala GSTM1 ve vztahu k nádorům prostaty. Riziko vzniku nádorového onemocnění vykazovalo mírný nárůst u bělochů, kteří byli nositeli GSTM1-null genotypu ( $OR=1,54$ ; CI 1,19-2,01). Tato vzestupná tendence je ještě více patrná u skupiny kuřáků, největší riziko bylo nalezeno u mužů, kteří vykouřili více než 30 balíčků za rok ( $P=0,007$ ) [Agalliu a kol., 2006]. Autoři studie provedené v USA se zaměřili na sledování glutathion – S – transferas. Pacienti v této studii trpěli nádorovým onemocněním hlavy a krku. Delece GSTM1 byla zaznamenána u 68% pacientů, ale jen u 48% kontrol ( $OR=2,37$ ; CI 1,20-4,67). Absence u GSTT1 genu byla nalezena u 45% pacientů, ale jen u 36% jedinců z kontrolní skupiny ( $OR=1,47$ ; CI 0,71-3,02) [Trizna a kol., 1995]. Další studie sledovala asociaci mezi delecí GSTM1 a GSTT1 genů a skvamózním typem karcinomu hlavy a krku. Delece genu GSTM1 byla nalezena u 53,1 % pacientů a 42,9 % kontrol

( $P < 0,05$ ). Delece GSTT1 genu byla detekována u 32,7 % pacientů a u 17,5 % kontrol ( $P < 0,001$ ) [Cheng a kol., 1999].

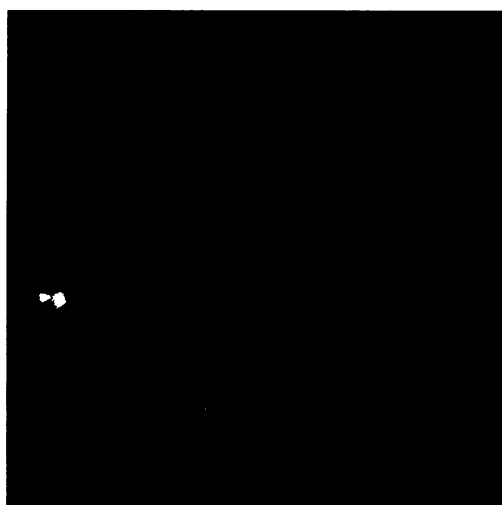
Ve studii provedené v Indii bylo publikováno zvýšené riziko vzniku nádorů plic ve vztahu ke genotypu GSTT1 – null (delece GSTT1 genu). Tento genotyp byl zjištěn u 21,9 % pacientů, ale pouze u 8,9 % kontrol ( $P = 0,014$ ;  $OR = 2,47$ ;  $CI 1,2-5,1$ ) U jedinců s delecí GSTM1 existovala asi 2,4x vyšší riziko vzniku nádorového onemocnění plic [Sreeja a kol., 2005]. Vztah GSTM1 k různým typům nádorového onemocnění je uveden v tabulce č. 4.

**Tabulka č.4: vztah nádorového onemocnění a GSTM1 polymorfismu**

Typ onemocnění	Sledovaný polymorfismus	Sledovaná populace	Pacienti (%)	Kontroly (%)	Statistika	Citace
Nádory hlavy a krku	GSTM1-plus	Američané	59 (32)	22 (52)	$OR = 2,37$ $CI 1,20-4,67$	Trizna a kol., 1995
	GSTM1-null		127 (68)	20 (48)		
Nádory hrtanu	GSTM1-plus	Poláci	152 (52,1)	157 (48,9)		Gajecka a kol., 2005
	GSTM1-null		140 (47,9)	164 (51,1)		
Nádory jater	GSTM1-plus	Číňané	23 (44)	69 (59)	$P = 0,006$	McGlynn a kol., 1995
	GSTM1-null		29 (56)	47 (41)		
Nádory vaječnicků	GSTM1-plus	Američanky	68 (49,2)	32 (41,6)	$P > 0,05$	Lallas a kol., 2000
	GSTM1-null		70 (50,7)	45 (58,4)		
Nádory prostaty	GSTM1-plus	Američané	248 (47,4)	274 (52,5)	$P = 1,54$	Agalliu a kol., 2006
	GSTM1-nul		311 (55,6)	248 (47,5)		

#### 2.5.1.5. NAD(P)H: chinon oxidoreduktasa 1 (NQO1)

##### Obr.5 3D struktura NQO1



NQO1 je dvouelektrodová reduktasa, která se účastní metabolismu chinonů. Patří mezi enzymy první fáze biotransformace. Jako donor elektronů využívá kofaktory NADH nebo NAD(P)H. Tento enzym je schopen redukce celé řady substrátů např. chinony, chinoniminy, glutathionyl-substituované naftochinony, dichlorofenolindofenol, azosloučeniny a nitrosloučeniny. Účastní se též bioaktivace protinádorových chinonů a nitrobenzenů (např. mitomycin C). NQO1 také konvertuje chinony na

relativně stabilní hydrochinony, které mohou být dále konjugovány a vylučovány, čímž

nedochází ke vzniku potenciálně toxických semichinonových radikálů (intermediáty přechodu mezi oxidovanou a redukovanou formou). Ne všechny hydrochinony jsou však stabilní. Labilní hydrochinony mohou reagovat s kyslíkem za vzniku zmíněných semichinonů. Chinony a jejich redukované formy (hydrochinony) jsou známými mutageny a tvoří adukty s DNA. Ztráta funkce enzymu může mít vliv na poškození DNA, jelikož při expozici látkám poskytujícím metabolity chinonů bude docházet k redukčním reakcím na hydrochinony, které mohou být labilní.

NQO1 je cytosolický enzym a vyskytuje se jako homodimér s jednou molekulou FAD (flavin adenin dinukleotid) v každé podjednotce [Siegel a kol., 2000, Belinsky a kol., 1993]. Gen je dlouhý 17,1 kbp a je lokalizován na chromosomu 16. Obsahuje 6 exonů a mRNA o velikosti 2,4 kbp. Kóduje protein s 275 aminokyselinami. V roce 1992 byla popsána tranzice C na T v pozici 609, která způsobuje záměnu prolinu na serin v kodonu 187 výsledného proteinu. Tento polymorfismus vede ke 3 fenotypům:

- 1) normální homozygot (Pro/Pro) – kompletní aktivita NQO1
- 2) heterozygot (Pro/Ser) – 3 x snížená aktivita
- 3) variantní homozygot (Ser/Ser) – bez aktivity NQO1. Úplná ztráta aktivity enzymu u variantního homozygota je pravděpodobně způsobena zvýšenou degradací variantního proteinu.

Frekvence variantní alely (NQO1\*2):

- 1) běloši: 13 – 24 % [Schulz a kol., 1998 ; Nebert a kol., 2002]
- 2) černoši: 22 % [Nebert a kol., 2002]
- 3) asiáté: 38 – 45 % [Naoe a kol., 2000 ; Yin a kol., 2001].

Exprese je indukovatelná oxidativním stresem, aromatickými uhlovodíky, fenolickými antioxidanty, průmyslovými akryláty a kovy. Řada nádorů produkuje vysokou hladinu NQO1.

Studie uveřejněná ve Španělsku v roce 2000 našla častější výskyt variantních homozygotů u skupiny pacientů (6,8 % ) oproti kontrolní skupině (3 %) (OR=2,36; CI 0,97-5,84; P=0,03). Pacienti v této studii trpěli nádory kolorekta. U skupiny mutovaných homozygotů byla nalezena velmi nízká až nulová aktivita enzymu. Tento enzym aktivuje vitamín K, který je funkční jako antioxidant a má antimutagenní efekt proti působení heterocyklických aminů z potravin. [Lafuente a kol., 2000].

Další studie se zabývala vztahem k nádorovému onemocnění plic. Bylo zjištěno, že pacienti, kteří byli nositeli alespoň jedné variantní alely, mají až 4 násobně větší riziko vzniku malobuněčného nádoru plic (OR=3,8; CI 1,19-12,1). Naproti tomu nebyla nalezena žádná souvislost mezi NQO1 genotypy a nemalobuněčným typem nádoru plic. [Lewis a kol., 2001]. Autoři následující studie publikovali souvislost mezi kombinací genotypů NQO1 (normální homozygot) s GSTT1 – plus genotypem (OR=2,15; CI 1,03-4,48; P=0,042). Tato kombinace genotypů vede ke zvýšenému riziku vzniku adenomu plic. [Sunaga a kol., 2002].

Studie provedená v Německu přinesla zjištění, že jedinci, kteří jsou nositeli jedné nebo dvou variantních alel, mají více než dvojnásobné riziko na vznik onemocnění jícnu (P=0,0003). [Sarbia a kol., 2003].

V roce 2005 byly potvrzeny výsledky předchozí studie provedené ve Španělsku [Lafuente a kol., 2000]. Také v této studii bylo nalezeno vysoké procento variantních homozygotů ve skupině pacientů s nádorovým onemocněním kolorekta. v porovnání s kontrolní skupinou (OR=1,5; CI 1,1-2,0) [van der Logt a kol., 2005].

## 2.6. GENOTOXICKÉ PŮSOBENÍ CHEMICKÝCH SLOUČENIN

Lidé pracující v chemickém průmyslu jsou při své činnosti vystaveni působení řady chemických sloučenin, které jsou po vstupu do organismu přeměňovány a metabolizovány na snáze vylučované metabolity. Mezi průmyslově významné látky patří např.: propylen oxid, epichlorohydrin, butadien a styren. *In vivo* jsou tyto látky metabolizovány pomocí cytochrom P450-dependentních monooxygenáz (CYP). Prvním krokem při detoxikaci těchto látek je inkorporace atomu kyslíku do substrátu, čímž dochází k transformaci lipofilních chemikálií na formu, která se lépe vylučuje. U řady chemických látek ovšem tato reakce vede k jejich aktivaci a přeměně na tzv. ultimativní karcinogen.

### 2.6.1. 1,3 butadien

Je to hořlavý plyn, který byl ve velkém množství produkován během druhé světové války. Dnes se využívá v průmyslu především při výrobě syntetických pryží a pryskyřic. Je rovněž součástí automobilových exhalací, cigaretového kouře atd.

Metabolizmem butadienu (BD) vznikají tři hlavní intermediáty. Jako jednotliví činitelé se od sebe liší v mutagenním potenciálu i dalších vlastnostech.

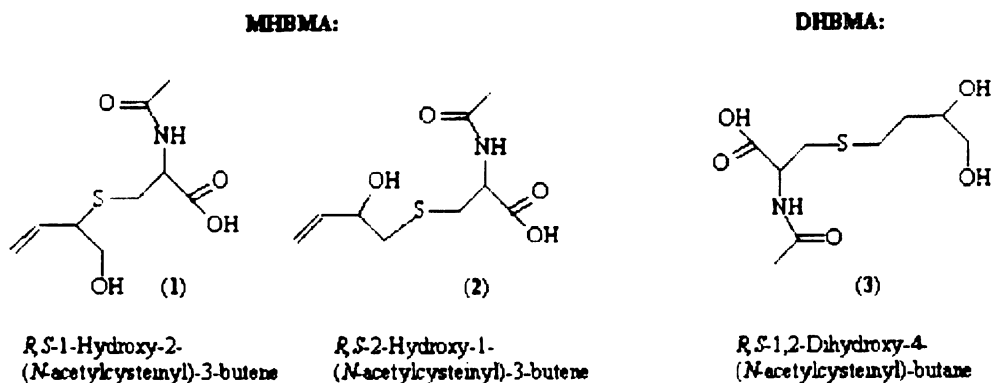
Prvním krokem při metabolismu BD je jeho přeměna na 3,4-epoxy-1-buten (EB). Tento proces je spojen přímo s cytochromy P450-konkrétně s CYP2E1 , ale také s CYP2A6 a CYP4B1. EB je dále konjugován s glutathionem na metabolit (M2), který je vylučován do moče. EB může též podléhat hydrolýze , k čemuž dochází působením mikrosomální epoxid hydrolázy (EPHX1), a formovat tak další intermediát buten-diol (BD-diol). BD-diol může být také konjugován s glutathionem (metabolit M1) a vyloučen do moče. Další možností je oxidace EB pomocí CYP2E1 za vzniku 1,2-dihydroxy-3,4-epoxybutanu (EBD).

Alternativní cestou metabolismu EB je další oxidace na 1, 2, 3, 4, - diepoxybutan (DEB). Tento metabolit může být hydrolyzován pomocí EPHX1 na EBD nebo může být konjugován s glutathionem (metabolit M3) a vylučován do moče. Tato série kroků zahrnující epoxidace a detoxikace dává vzniknout třem elektrofilním metabolitům: EB, DEB a EBD. Je nutné podotknout, že pouze u prvních dvou bylo provedeno kvantitativní měření,. Naopak podmínky vzniku EBD byly zkoumány v *in vitro* studiích, které byly prováděny s mikrosomy izolovanými z jater hlodavců (myši, potkani) a také s lidskými mikrosomy. Závěrem těchto studií bylo zjištění, že jednotlivé metabolity se mohou lišit vzájemně ve svém mutagenním potenciálu až 200krát. DEB je pokládán za nejvíce mutagenní, naopak EBD za nejméně.

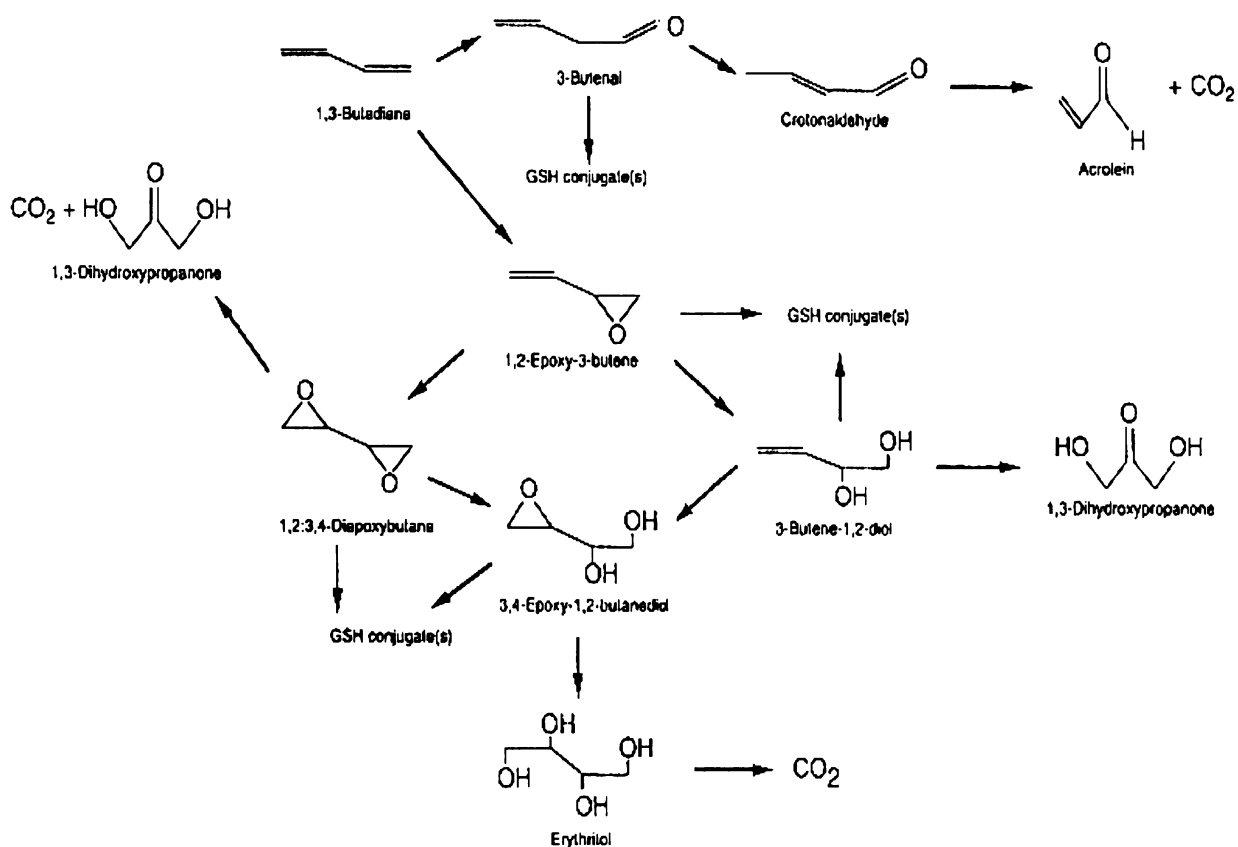
#### **2.6.1.1. Metabolity M1 a M2**

Hlavními metabolity BD vylučované močí jsou dihydroxy-butyl-merkapturová (DHBMA, M1) a monohydroxybutenyl-merkapturová (MHBMA, M2) kyselina. U M2 metabolitu byly zaznamenány dvě izoformy: R,S-1-hydroxy-2-(N-acetylcysteinyl)-3-buten a R,S-2-hydroxy-1-(N-acetylcysteinyl)-3-buten. Předpokládá se , že DHBMA je indikátorem hydrolýzy 3, 4-epoxy-1-butenu (EB) , zatímco MHBMA indikuje detoxikaci tohoto epoxidu pomocí konjugace s glutathionem.. Lze tedy určit, kolik EB je přeměňováno a vylučováno močí [Urban a kol., 2003].

## Struktury merkapturových kyselin



## Schéma metabolismu BD



Anderson D. Butadiene: species comparison for metabolism and genetic toxicology. *Mutat Res.* 1998;405(2):247-58. Review.



## 2.6.2. DNA adukty

Expozice BD dává vzniknout řadě DNA aduktů. Metabolity BD se váží do N7 – pozice guaninu, N3 – pozice thymidinu a N1-, N3-, a N6- pozice adeninu. Komplikace při identifikaci a kvantifikaci jednotlivých aduktů může přinášet diastereomerní povaha nukleosidů a nukleotidů.

Studie provedená v roce 1999 Koiem byla zaměřena na výzkum DNA aduktů u potkanů a myši exponovaných BD v rozmezí od 20 do 625 ppm po dobu 4 týdnů. Bylo nalezeno mnohem větší zastoupení trihydroxybutylového aduktu v poloze N7 u guaninu (THB – G) v porovnání s hydroxybutenylovým aduktem v poloze N7 guaninu (EB – G).

K identifikaci jednotlivých aduktů zde byla použita kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC – MS – MS). Původně bylo předpokládáno, že THB – G adukty pochází z vazby DEB na molekulu DNA, ale zjištění, že zastoupení těchto aduktů je větší než EB – G aduktů bylo v rozporu s očekávaným výsledkem. DEB metabolit totiž vzniká ve velmi malém množství u potkanů i u myši a tudíž nemůže být původcem vzniku tak velkého množství THB – G aduktů [Koi a kol., 1999]. Dalším předpokladem tedy bylo, že adukty pocházejí z EBD metabolitu. Tento předpoklad potvrdil v roce 1999 Koivisto. Použil metodu zvanou <sup>32</sup>P – postlabelling. Pomocí této metody lze rozeznat, zda-li je THB – G adukt původem z EBD nebo z DEB. Závěrem studie bylo zjištění, že 98 % zmíněných aduktů pochází z EBD metabolitu [Koivisto a kol., 1999].

O dalších metabolitech je známo méně informací. THB adukty v pozici N3 u adeninu vznikají v malém množství a jsou rychle eliminovány depurinací a opravnými systémy. N6 adukt adeninu je zaznamenávám ve velmi malém zastoupení – přibližně 4 na 10<sup>9</sup> nukleotidů. [Zhao a kol.; 1998]. Sledování významnosti tak malého množství aduktů je problematické.

### 2.6.2.1. Metody určování aduktů (modifikací) v DNA

Detekce aduktů a jiných prekarcinogenních lézí v DNA je limitujícím faktorem v poznávání jednotlivých molekulárních mechanismů a počátečních fází vzniku nádorového onemocnění. Proto v dnešní době dochází k vyvíjení stále citlivějších a specifitějších metod vhodných pro výzkum DNA aduktů.

Metoda využívající synteticky připravené radioaktivní preparáty jednotlivých karcinogenů (značených <sup>3</sup>H nebo <sup>14</sup>C) se dodnes používá pro testování karcinogenity chemických sloučenin. Výhodou této metody je vysoká specifika radioaktivity značících látek, nevýhodou ovšem je, že nemůže být použita u člověka.

Stanovení, která jsou použitelná pro analýzu (biomonitorování) lidského materiálu musí splňovat mnoho podmínek 1) dostatečná citlivost pro detekci velmi nízkých koncentrací aduktů, dále musí být 2) efektivnost, tj., aby na stanovení bylo dostačující pouze mikrogramové množství DNA, 3) výsledky musí kvantitativně odpovídat expozici, 4) využitelnost i pro sloučeniny, jejichž strukturu neznáme a 5) schopnost separace jednotlivých aduktů, k jejich kvantifikaci a případně i identifikaci.

Pro humánní použití se nejvíce využívají metody imunochemické, fluorescenční, hmotnostní spektroskopie spojená s ionizací elektronů (ESI-electron spray ionization MS), laserová ionizace (MALDI-matrix-assisted laser desorption ionization MS) a <sup>32</sup>P-postlabelling. Nejvíce podmínek, které jsou vyžadované pro humánní použití splňuje právě <sup>32</sup>P-postlabelling. Výhodou metody je to, že analýza poškození DNA se provádí až po odebrání vzorku z organismu. Tato metoda např. přispěla k nalezení ultimativních forem karcinogenního barviva Sudanu I nebo k prokázání přímé kovalentní vazby N-nitroso-N-methylanilinu na DNA [Stiborová a kol., 1999].

### 2.6.3. Hemoglobinové adukty

Adukty vznikající v molekule hemoglobinu (Hb) jsou využívány jako biomarkery expozice BD i jiným chemickým sloučeninám. Tyto adukty přinášejí řadu výhod do epidemiologických studií. Dochází totiž k jejich akumulaci v červených krvinkách, jejichž doba života je u člověka asi 120 dní. U hlodavců je tato doba kratší – 40 dní u myši a 63 dní u potkanů. V řadě studií prováděných *in vivo* se hemoglobin využívá jako biomarker místo DNA.

Prvním metabolitem BD, který reaguje s Hb je EB. Dochází k formování N – (2-hydroxy-3-butenyl) valinového aduktu (MHB Val). Ve studii provedené v roce 1993 Ostermanem a Golkarem byla nalezena u nekuřáků koncentrace aduktů v rozmezí 1 – 3 pmol/g globinu. Pracovní expozice byla nižší než 1 ppm. Zaznamenané množství aduktů bylo u lidí nižší než u hlodavců exponovaných dávce cca 2 ppm [Osterman and Golkar, 1993]. Toto zjištění potvrdila studie z téhož roku provedená Albrechtem, kde bylo nalezeno asi 5krát vyšší množství Hb aduktů u myši než u potkanů (17nmol/g globinu a 3,5 nmol/g globinu) [Albrecht a kol., 1993]. V jiné studii bylo porovnáno množství aduktů mezi oběma pohlavími u myši exponovaných 1000 ppm BD. Expozice trvala 13 týdnů. Vyšší množství MHB Val aduktů bylo nalezeno u samic [Tretyakova a kol.; 1996].

Dalším aduktem hemoglobinu, který byl identifikován je N-(2, 3, 4 – trihydroxybutyl) valin (THB Val). O tomto aduktu se předpokládalo, že vzniká z DEB s jeho následnou hydrolyzou na trihydroxy adukt. V roce 1997 provedl Perez studii na potkanech. Zaměřil se na formování THB Val aduktu a došel k závěru, že tento adukt vzniká přednostně interakcí hemoglobinu s EBD [Perez a kol., 1997]. Tuto spornou otázku prozkoumal podrobněji Swenberg. K určení tohoto aduktu použil plynovou chromatografii ve spojení s hmotnostním spektrometrem (GC-MS). Demonstroval THB Val adukt jako majoritní adukt Hb u hlodavců a u lidí. U myši a potkanů byl poměr THB Val ku MHB Val 64:1 respektive 27:1, což potvrzuje úvahu, že tvorba aduktů Hb je u myši vyšší než u potkanů. Lze tedy říci, že myši jsou méně způsobilé k metabolismu DEB na EBD, a proto je u nich nalézáno vyšší zastoupení THB Val aduktů [Swenberg a kol., 2001].

Užitečnost sledování aduktů Hb byla prokázána Hayesem. V této studii byly sledovány frekvence THB Val aduktů, mutací v markerovém genu hypoxanthinuaninfosforybosyltransferasy (HPRT), záměny sesterských chromatid (SCE) a chromozomálních aberací (CA). Množství THB Val aduktů odpovídalo expozici BD.

U dalších sledovaných genotoxických projevů nebyl nalezen žádný rozdíl ve výskytu mezi exponovanými a neexponovanými jedinci [Hayes a kol., 2000]. V roce 1995 provedl Kelsey studii zaměřenou na sledování SCE u jedinců s delecí GSTT1. *In vitro* zkoumal lidské lymfocyty exponované DEB, kde našel vyšší zastoupení SCE [Kelsey a kol., 1995].

V roce 1996 poukázal Rydberg na další adukt Hb. Vzniká vazbou DEB na N-terminální valin globinu, jedná se o N, N-(2, 3-dihydroxybuta-1, 4-diy) valin (PYRV). Tento adukt však není vhodný k využití v monitorování genotoxických efektů BD [Rydberg a kol., 1996]. Studie sledující DNA a Hb adukty silně podporují závěr, že EBD je jedním z hlavních elektrofilních metabolitů, který se váže do struktury těchto makromolekul. EB, který je prekurzorem EBD, není strukturně tak výhodný pro vazbu na DNA či Hb. Vedle EBD je schopen tvorby aduktů též DEB. Má také elektrofilní povahu a je považován za velmi významný z hlediska svého mutagenního a karcinogenního potenciálu. Velmi výrazné rozdíly bývají nacházeny v naměřeném množství DEB u myši, potkanů a lidí. Studie z roku 1994 provedená Cochranem přinesla závěr ohledně mutagenity metabolitů. DEB vykazoval až 100krát vyšší mutagenitu než EB a 200krát vyšší než EBD [Cochran a kol., 1994].

Sledování biomarkerů genotoxicity pomáhá určit citlivost jedinců vůči různým polutantům životního prostředí. Slouží též k posouzení významu genetických polymorfismů a jejich úlohy ve vzniku nádorových onemocnění.

V roce 2000 byla v Číně provedena studie na 41 pracujících, kteří byli exponováni BD (střední hodnota expozice byla 2 ppm). Srovnání bylo vztaženo k 38 neexponovaným kontrolám. U exponované skupiny byla zaznamenána zvýšená hladina lymfocytů ( $P=0,002$ ) a zároveň krevních destiček ( $P=0,07$ ) v porovnání s kontrolami. Množství THB-Val aduktů korelovalo s expozicí, ale genotoxické projevy (SCE, HPRT mutace) nebyly u exponovaných pracovníků ve srovnání s kontrolami významně odlišné [Hayes a kol., 2000]. Autoři další studie se zabývali monitorováním THB-Val a MHB-Val aduktů. Výskyt obou aduktů odpovídal expozici, která byla 1 ppm. Frekvence genotoxických projevů se ani zde nelišila mezi pracujícími, kteří byli exponováni, a kontrolami. Vztah nebyl nalezen ani mezi polymorfismy glutathion S-transferas GSTM1 a GSTT1 a zastoupením aduktů [Albertini a kol., 2001]. Zvýšené množství THB-Val aduktů u exponovaných osob oproti kontrolám nebylo zjištěno ani ve studii provedené v roce 2002. Množství M1 metabolitu vylučovaného močí korelovalo s expozicí, která byla 2 ppm. Prokázán byl ovšem vliv kouření na formování THB-Val aduktu ( $P=0,027$ ). Sledování delece u GSTM1 a GSTT1 přineslo pozitivní nález vztahu ke zvýšenému množství aduktů (GSTM1 delece,  $P=0,017$ ) a (GSTT1 delece,  $P=0,05$ ) [Fustioni a kol., 2002]. V roce 2004 byla uveřejněna studie zaměřená na sledování biomarkerů genotoxicity (CA a SSB) v souvislosti s polymorfismy genů kódujících biotransformační enzymy. V úvahu byly brány geny pro CYP2E1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 a GSTP1. Nebyla nalezena žádná asociace mezi zjištěnými biomarkery a genetickými polymorfismy u GSTM1, GSTT1 a GSTP1. U jedinců s vyšší expresí CYP2E1 byla zaznamenána zvýšená frekvence CA, ale nešlo o statisticky významné zvýšení ( $P=0,097$ ). Výrazně vyšší frekvence CA byla nalezena u exponovaných osob s genotypy způsobujícími nízkou aktivitu EPHX1 ( $P=0,05$ ) v porovnání s osobami s vysokou a střední aktivitou enzymu [Vodicka a kol., 2004].

Další studie sledovala SCE a další biomarkery u skupiny exponované nízkým koncentracím BD (průměrné množství dosahovalo  $1,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Množství biomarkerů v exponované oproti neexponované kontrolní skupině nebylo významně zvýšené. Pokud byli u exponované skupiny bráni v úvahu kuřáci, bylo nalezené množství SCE významně vyšší ( $P=0,004$ ) [Lovreglio a kol., 2005].

#### **2.6.4. Styren**

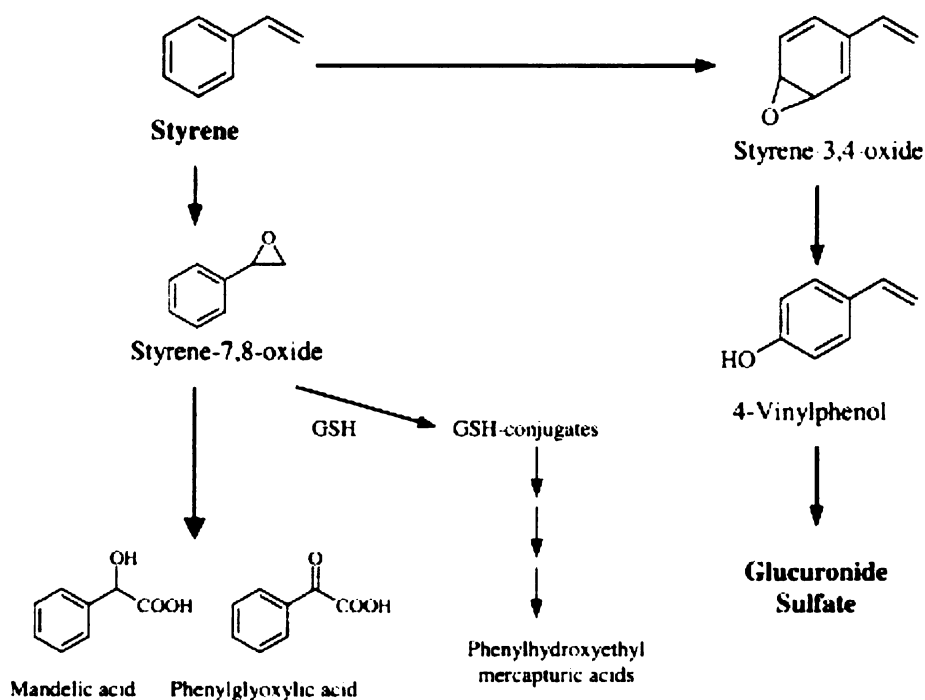
IARC klasifikoval styren jako možný karcinogen pro lidi (skupina IIB) a jeho metabolit styren oxid jako pravděpodobný lidský karcinogen (skupina IIA). Styren je *in vivo*

metabolizován řadou biotransformačních enzymů, např.: CYP2B6, CYP2E1, CYP1A2, CYP2F1 a CYP3A4. Majoritním metabolitem je styren 7,8-oxid (SO). SO se váže kovalentní vazbou na biologické makromolekuly, především na DNA. Minoritním metabolitem je styren 3,4-oxid, o kterém je zatím známo mnohem méně informací.

SO je schopen atakovat nukleofilní místa na DNA pomocí dvou uhlíků označovaných  $\alpha$  a  $\beta$ . Vazba pomocí  $\beta$ -uhlíku probíhá na dusík, který je vázán přímo v aromatickém kruhu purinů a pyrimidinů.  $\alpha$ -uhlík reaguje naopak s exocyklickými amino skupinami. Mezi nejvíce atakované báze patří guanin. Hlavním místem alkylace guaninu je N7-pozice, dále pak N2- a O6-pozice. Adenin je nejčastěji alkylován na N3-, N1- a N6-pozicích. U cytosinu dochází k substituci na N3- a N4- pozicích. V nejmenší míře je alkylován thymidin, a to na N3-pozici. Na metabolismu SO se podílí EPHX1, která otvírá aromatický kruh a formuje styren glykol (SG). Jeho další oxidace pomocí alkohol- a aldehyddehydrogenas vede k tvorbě mandlové kyseliny (MA) a fenyglyoxylové kyseliny (PGA). Minoritní cestou, která vede k odbourávání SO, je obdobně jako u BD konjugace s glutathionem. Enzymy, které katalyzují tyto reakce jsou glutathion S-transferasy (GST). Konečným produktem, který takto vzniká je fenyhydroxyethyl merkapturová kyselina (PHEMA). Její exkrece je silně ovlivněna polymorfismem GSTM1 [De Palma a kol., 2001]. Další minoritní cestou, která je velmi málo prozkoumaná je oxidace postranního řetězce styrenu na 4-vinylfenol (4-VP). Tento metabolit byl poprvé zaznamenán u potkanů v roce 1970 [Bakke a kol., 1970]. 4-VP může být též konjugován za vzniku glukuronidu (4-VP-G) nebo sulfátu (4-VP-S) [Watabe a kol., 1982]. 4-VP byl zaznamenán v moči zaměstnanců, kteří byli exponováni styrenu [Pfäffli a kol., 1981], ale také u dobrovolníků, kteří byli exponováni parám styrenu [Haufröid a kol., 2002].

Studie prezentovaná v roce 1999 byla provedena na skupině zaměstnanců pracujících v závodě na výrobu plastů. Sledovány zde byly  $O^6$ -guaninové adukty, N-terminální adukty valinu v Hb, jednořetězcové zlomy (SSB) a frekvence mutací HPRT v T-lymfocytech.  $O^6$ -guaninové adukty byly výrazně více zastoupeny ve skupině exponovaných ( $5,9 \pm 4,9$  aduktů/ $10^8$  nukleotidů) ve srovnání se skupinou kontrolní ( $0,7 \pm 0,8/10^8$ ,  $P=0,001$ ). N-terminální adukty valinu byly zaznamenány u skupiny exponovaných ( $1,7 \pm 1,1$  pmol/g globinu), ale ne u kontrol (detekční limit 0,1 pmol/g globinu). Množství těchto aduktů zároveň korelovalo s expozicí. Statisticky významný rozdíl byl nalezen ve frekvencích mutací HPRT (exponovaní,  $22,3 \pm 10,6/10^6$ ; kontroly,  $14,2 \pm 6,5/10^6$ ;  $P=0,039$ ) [Vodička a kol., 1999]. V další práci byla pracovní expozice styrenu sledována u zaměstnanců pracujících v laminárnách. Sledovány zde byly DNA adukty, konkrétně  $O^6$ -guaninový adukt, dále CA, SSB a adukty Hb. Styrenem indukované adukty Hb byly výrazně vyšší u exponované skupiny

### Schéma metabolismu styrenu



( $2,7 \pm 1,87$  pmol/g globinu) v porovnání s kontrolami ( $0,5 \pm 0,8$  pmol/g globinu,  $P=0,001$ ). Tyto adukty dobře slouží také jako parametry expozice styrenu, jelikož odrážejí atak reaktivního SO na valin v Hb. Množství zaznamenaných aduktů Hb v této studii korelovalo s mírou kumulativní expozice ( $P=0,006$ ). Statisticky vyšší množství O<sup>6</sup>-guaninových DNA aduktů bylo zaznamenáno v lymfocytech exponovaných pracovníků oproti kontrolám ( $8,3 \pm 6,3$  aduktů/ $10^8$  nukleotidů respektive  $0,8 \pm 0,07/10^8$ ,  $P=0,001$ ). Zastoupení aduktů guaninu silně korelovalo s expozicí styrenu ( $P=0,006$ ). Frekvence SSB byla, stejně jako u předchozích biomarkerů, vyšší u exponované skupiny ( $23,9 \pm 10,6$ ) ve srovnání se skupinou kontrolní ( $10,7 \pm 5,3$ ;  $P=0,001$ ). Výrazný rozdíl byl taktéž zaznamenán ve frekvenci CA mezi exponovanou a kontrolní skupinou. Velmi významný vliv na CA měla kumulativní expozice styrenu ( $P=0,003$ ) [Vodička a kol., 2003]. Následující studie provedená o rok později přinesla výsledky, které byly v určitém rozporu se závěry studie publikované v roce 1999. SSB v DNA byly výrazně nižší u exponovaných osob než u kontrol. Tento rozpor mohl být zapříčiněn rozdíly ve studovaných populacích nebo různou délkou pracovního poměru. Ve studii uveřejněné v roce 1999 byli zaměstnanci exponovaní v průměru 14 let, kdežto v této studii byl průměr délky pracovního poměru menší než 4 roky. Kapacita reparačních systémů DNA byla vyšší u exponovaných pracovníků ve srovnání

s kontrolami. Toto zvýšení odráží efektivní stimulaci DNA reparačních systémů po expozici styrenu. V této studii byly také sledovány specifické metabolity styrenu vylučované v moči. Tyto metabolity vznikají při konjugačních reakcích jako produkty minoritní cesty metabolismu styrenu. Množství MA, PGA a 4-VP u exponovaných bylo až 10krát vyšší než u kontrol. Koncentrace diastereomerů PHEMA byla  $1,8 \pm 1,4$  mg/g kreatininu a  $1,4 \pm 1,3$  mg/g kreatininu pro M2 u exponovaných styrenu, kdežto u kontrolní skupiny nebyly zaznamenány [Vodička a kol., 2004].

### **2.6.5. Strukturní chromosomální aberace**

Kontinuita molekul DNA může být působením mutagenních vlivů porušena. Dochází ke vzniku CA. CA se hodnotí v 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. Za normální se považuje 1-2 % výskyt CA. Nález výrazně vyšších hodnot svědčí o mutagenní expozici. Enzymy reparačních systémů jsou schopné napojit volné konce DNA. Napojení se děje na základě komplementarity bazí. I přesto, že tyto enzymy pracují s velkou a přesností a specifickou, může dojít k chybnému napojení částí molekul DNA. Vznikne tak změněný chromosom, který je dál předáván do dceřinných buněk. Přestavba může být stabilní, pokud si chromosom zachová centromeru a telomery. Dojde-li ovšem ke ztrátě jedné z těchto součástí, hovoříme o tzv. nestabilní přestavbě. Strukturní přestavby mohou poté svými fenotypovými projevy poškodit zdraví jedince nebo jeho potomků. CA jsou nyní jedním z nejsledovanějších genotoxických projevů.

#### **2.6.5.1. Typy CA**

##### **2.6.5.1.1. Delece**

Hovoříme-li o chromosomální delecii, hovoříme o ztrátě části chromosomu. Známa je tzv. terminální delece, kdy se jedná o ztrátu koncové části chromosomu. Vzniká zlomem chromosomu a následnou ztrátou centrického fragmentu. Dalším typem je tzv. intersticiální delece. V tomto případě dochází ke ztrátě střední části chromosomu. Mezi zvláštní typy delecí patří ring chromosom (prstencový chromosom). Vzniká současným zlomem obou ramének chromosomu a jejich následným spojením. S delecí se rovněž spojuje vznik dicentrického

chromosomu. Tento nestabilní útvar vzniká při současném zlomu dvou chromatid a jejich spojení. Vzniklý chromosom tak obsahuje dvě centromery.

#### **2.6.5.1.2. Duplikace**

Chromosomové duplikace mívají obvykle méně závažné klinické projevy než delece. Vznikají crossing-overem nebo nepravidelnou segregací chromosomů s translokacemi. Ve fenotypu se projevuje efekt dávky.”

#### **2.6.5.1.3. Inverse**

Inverse je strukturní přestavba, při které dochází k přerušení kontinuity chromosomu. Vzniká dvěma zlomy a následným napojením odlomených částí v opačném pořadí. Ve vztahu k centromere hovoříme o tzv. paracentrické a pericentrické inversi. Paracentrická inverse je spojena s částmi chromosomu mimo centromeru., kdežto inverse úseku s centromerou je označována jako pericentrická. inverse. Při pericentrické inversi může docházet ke změně délky ramen chromosomu.

#### **2.6.5.1.4. Translokace**

Při translokaci je část chromosomu vyštěpena z původního chromosomu a připojena k chromosomu jinému. Vzniká přemístěním částí chromosomů mezi nehomologními chromosomy. Translokace mohou být balancované (zachovává se stejné množství genetické informace v buňce) nebo nebalancované (původní množství není dodrženo). Tzv. reciproká translokace vzniká současným zlomem dvou nehomologních chromosomů a vzájemnou výměnou oddělených částí. Může ovšem vzniknout i náhodným crossing-overem mezi nehomologními chromosomy. Počet chromosomů se nemění. Při tzv. Robertsonově translokaci dochází ke zlomu dvou akrocentrických chromosomů s následnou fúzí dlouhých ramének obou chromosomů. Vzniká balancovaný karyotyp, jedinec většinou nemá žádné fenotypové projevy, současně má však vysoké riziko, že jeho děti budou postiženy nebalancovanými chromosomálními aberacemi.

#### **2.6.5.2. Metody určování CA**

Metody pro sledování CA slouží pro posouzení genotoxických vlastností různých chemických sloučenin. Mezi nejčastěji používané stanovení patří Giemsa barvení a fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH).



První zmíněná metoda poskytuje informace o místech, kde dochází přednostně ke zlomům. Nyní se stále více využívá k detekování množství CA, které vznikají po expozici chemickým látkám nebo vlivem jiných podnětů, např.: působením radioaktivního záření. Pomocí této metody bylo například zjištěno, že centromerní heterochromatin v lidských chromosomech je regionem, kde dochází velmi často ke zlomům.

FISH využívá tři různých typů DNA sond, které rozeznávají repetitivní DNA sekvence. Detekce aberací je založena na vizualizaci barevných změn chromosomů v metafázi. Tato metoda představuje vhodný způsob jak studovat CA, které jsou stabilní. Jde především o translokace a inverse. Tyto druhy aberací se klasickými metodami obtížně kvantifikují [Holečková a kol., 2004].

### 3) CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo:

- 1) stanovit frekvence polymorfismů enzymů metabolizujících cizorodé látky a získat tak soubor dat o individuální vnímavosti vůči polutantům v životním prostředí stredoevropské populace
- 2) posoudit možné vztahy mezi hlavním biomarkerem genetického poškození, chromosomálními aberacemi a individuální vnímavostí
- 3) přispět k zacílení dalších studií vedoucích k poznání příčin vzniku rizika nádorových onemocnění, které je ve stredoevropské populaci poměrně vysoké

Diplomová práce se zabývala studiem části velkého souboru více než 1200 osob u nichž byly v rámci řady mezinárodních studií odebrány vzorky genetického materiálu a stanoveny frekvence chromosomálních aberací. Současně sledované osoby poskytly informace do dotazníku cíleného k poznání základních faktorů jejich životního stylu. Cílem celé studie je nalezení vztahu mezi poškozením genetického materiálu, expozicí a genetickou vnímavostí, která je sledována prostřednictvím polymorfismů v genech metabolismu, opravy DNA a základních buněčných funkcí (dělení, apoptosa, apod.).

## 4. METODIKA PRÁCE

### 4.1. Charakteristika sledovaného souboru

Do studie bylo zařazeno celkem 413 zdravých osob, zaměstnaných v průmyslu zpracování plastických hmot, v nemocnicích a na úřadech. Náběry byly uskutečněny v městských aglomeracích západního Slovenska ve městech Bratislava, Liptovský Mikuláš, Martin, Púchov, Ružomberok a Trstená. Populace byla složena z 250 žen a 163 mužů o průměrném věku 39 let. Kuřáci představovali 30% ze sledovaného souboru. Nábor osob byl veden tak aby základní socioekonomické charakteristiky byly v souboru zastoupeny rovnoměrně. 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 kohorta reprezentuje etnicky homogenní populaci a z tohoto hlediska je vhodná pro sledování vztahu mezi biomarkery poškození DNA a genetickými polymorfismy genů metabolismu cizorodých látek. 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). Podrobná charakteristika souboru a jednotlivých podsouborů je uvedena v tab.č. 4 a 5.

**Tabulka č. 4: Charakteristika věkového a pohlavního složení souboru**

	ženy (n=250)	muži(n=163)	celý soubor (n=413)
věk	40,7 ± 16,0	36,2 ± 15,5	39,00 ± 16,0
věk	38,0 ± 1,0	29,5 ± 1,2	36,0 ± 0,8
věk, rozpětí	20 - 71	20 – 70	20 – 71

**Tabulka č. 5: Charakteristika souboru podle kouření**

	ženy (n=250)	muži (n=163)	celý soubor (n=413)
nekuřáci	191 (77%)	96 (59%)	287 (70%)
kuřáci	58 (23%)	66 (41%)	124 (30%)
věk kuřáků, hodnota ± SD	37,8 ± 14,0	36,0 ± 13,8	
věk nekuřáků, hodnota ± SD	41,6 ± 16,5	36,5 ± 16,5	

#### 4.2. Souhlas etické komise

Design studie byl schválen Etickou komisí Martinské fakultní nemocnice a Etickou komisí Ústavu experimentální medicíny AV ČR.

#### 4.3..Analýza chromosomálních aberací

Na detekci chromosomálních aberací (CA) byla použita metoda cytogenetické analýzy lymfocytů periferní krve - CALPL. Kultivace byla provedena v médiu RPMI-1640 obohaceném o prekolostrální telecí sérum při 37° C. Mitotická aktivita byla vyvolána růstovým stimulem, fytohemaglutininem. Pro každého jedince byly založeny 2 kultury krevních vzorků. Po 48 hod. kultivaci bylo buněčné dělení zastaveno roztokem kolchicinu. Po hypotonizaci v 0,075 M roztoku KCl a fixaci ve směsi metanol-kys.octová (3:1) byla získána kultura lymfocytů. Z každého vzorku byly připraveny 2 preparáty a obarveny zásaditým barvivem podle Giemsa-Romanowski [Valjus a kol., 1993]. Od každého pracovníka bylo mikroskopicky vyhodnoceno 100 mitóz s pomocí světelného mikroskopu při zvětšení 1500-krát. Pro hodnocení byly použity pouze mitózy s dostatečně oddělenými chromatidami ve stádiu metafáze buněčného dělení. Počet stanovených aberantních buněk znamená počet buněk, ve kterých se vyskytl chromatidový nebo chromosomální zlom, příp. chromatidová nebo chromosomální výměna (AHEM, 1989). Chromatidové a chromosomální zlomy tvořily minute, diminute, terminální delece, terminální zlomy a acentrické fragmenty. Chromatidové a chromosomální výměny tvořily triradiály, kvadriradiály, dicentrické chromosomy s fragmentem, tricentrické chromosomy s fragmentem, translokace chromozómů a prstencové (ring) chromosomy. Analýzy CA byly provedeny na pracovištích Oddělení lékařské biologie, Jesseniovy lékařské fakulty v Martině a Státního zdravotního ústavu v Bratislavě. Výsledky

byly získány se souhlasem pracovníků výše uvedených ústavů reprezentovaných MUDr. Ludovítem Mušákem, PhD (Martin) a MUDr. Marií Dušínskou, CSc. (Bratislava) v rámci dlouhodobé spolupráce.

#### **4.4. Izolace DNA z krve**

Vzorky krve byly odebírány do vakuových odběrových zkumavek Vacutainer a dopraveny do laboratoře, kde byly zpracovány.

##### **4.4.1. Izolace lymfocytů**

Krev z Vacutaineru byla ponechána na ledu při 5 °C do úplného rozmrazení. Poté byla přelita do zkumavek typu Falcon s objemem 15 ml a doplněna lyzačním roztokem (dále LR) na celkový objem 14 ml. Zkumavky s krví byly umístěny na rotátor na dobu 10 min. a krev se nechala lyzovat. Poté byla krev ve zkumavkách umístěna na 30 min. do lednice nebo do vychlazené centrifugy a každých 5 min. promíchávána otáčením, čímž se ještě zlepšilo lyzování. Následně byly zkumavky centrifugovány po dobu 15 min. při 6000 rpm při 5 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla promyta 4 ml sterilní destilované vody Milli Q (MQ). Poté byla opět provedena centrifugace při stejných podmínkách. Tento postup byl opakován, dokud peleta nebyla bílá. Dále následovala izolace DNA nebo bylo možné vzorky zamrazit a DNA izolovat později.

##### **4.4.2. Izolace DNA**

K peletě bylo přidáno 800 µl pufru pro proteinasu K, byla provedena resuspendace na vortexu a bylo přidáno 25 µl roztoku proteinasy K. Následně bylo přidáno ještě 100 µl 10% SDS, 1 ml 5M NaCl a 2,4 ml sterilní MQ. Proběhla opět resuspendace a zkumavka se nechala točit 10 min. na rotátoru. Do každé zkumavky bylo napipetováno 2,5 ml extrakční směsi a směs byla ponechána na rotátoru po dobu 15 min. Poté proběhla centrifugace při 6000 rpm po dobu 15 min. při 5 °C. Po centrifugaci byl obsah ve zkumavce rozdělen na dvě fáze. Vreční čirá část obsahovala DNA, která se opatrně odebrala do čisté zkumavky, do které

byly předem napipetovány 4 ml 96% chladného ethanolu. Falkonkou se opatrně několikrát otočilo až do vytvoření viditelných precipitátů DNA. Dalším krokem izolace byla centrifugace při 6000 rpm při 5 °C po dobu 15 min. Supernatant byl odstraněn a peleta byla promyta 70% ethanolem. Následovala centrifugace za stejných podmínek. 70% ethanol byl odsát pipetou a peleta se nechala sušit při pokojové teplotě po dobu několika hodin. Dokonale vysušená peleta se nechala rozpustit v 1 ml sterilní MQ. Po izolaci byla na přístroji Cary 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA ) změřena u všech vzorků koncentrace a čistota DNA. 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:

$$c = 50 \times A_{260} \times n$$

c ... koncentrace v  $\mu\text{g/ml}$

n ... ředění vzorku

Dosažené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 20 - 500  $\mu\text{g DNA/ml}$ . Vzorky byly naředěny na 10  $\mu\text{g DNA/ml}$ . Naředěné DNA byly používány pro PCR reakce. Koncentrované vzorky byly skladovány při -20 °C.

## 4.5. Genotypování

### 4.5.1. Obecná charakteristika genotypování

Ke zjištění genotypu byla použita metoda polymerasové řetězové reakce s následnou restrikční analýzou fragmentů (PCR – RFLP).

### 4.5.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR - polymerase chain reaction)

Metoda polymerázové řetězové reakce slouží k namnožení určitého úseku DNA pomocí termostabilní Taq polymerázy. V reakční směsi jsou zapotřebí dva primery, které ohraničují daný úsek DNA, reakční pufr Taq polymerázy,  $\text{MgCl}_2$ , dNTP (deoxyribonukleosidtrifosfáty) a Taq polymeráza. Pro PCR je nutná znalost DNA sekvence pro vytvoření primerů..

Amplifikace DNA probíhá ve třech po sobě jdoucích krocích, které tvoří jeden cyklus PCR:

1. Denaturace DNA při 94°C.

2. Nasednutí specifických primerů při teplotě, kterou lze teoreticky odvodit podle  $T_M$  (melting temperature, teplota tání) primerů, ale je třeba ji experimentálně ověřit pro různé koncentrace  $MgCl_2$ .

3. Prodlužování dceřiných řetězců při 72°C.

Počet cyklů může být 25-40. Před začátkem prvního cyklu probíhá většinou celková denaturace DNA, pět minut při 94°C.

Výsledek PCR ovlivňuje množství a čistota použité DNA, teplota a délka jednotlivých kroků v cyklu, počet cyklů, koncentrace  $MgCl_2$ , dNTP, primerů.

### **Obecné podmínky pro PCR reakci:**

- celkový objem: 25  $\mu$ l
- množství DNA: 50-100 ng
- koncentrace dNTP: 0,2 mM
- koncentrace primerů: 0,25 mM (forward pro + vlákno, reverse pro – vlákno)
- Taq-Purple polymerasa 1U/vzorek
- koncentrace  $MgCl_2$ : různá, je uváděna u jednotlivých reakcí
- jednotlivé programy amplifikace: různé, jsou uváděny u jednotlivých reakcí

### **Kontrola PCR produktů**

Kontrola výsledku PCR reakce byla prováděna pomocí horizontální elektroforézy ve 3% agarózovém gelu. Na gel bylo nanášeno 8  $\mu$ l PCR produktu. Velikost produktu byla určována podle markeru délky fragmentů DNA Phi174/HaeIII (1,353bp, 1,078bp, 872bp, 603bp, 310bp, 281bp, 271bp, 234bp, 194bp, 118bp, 72bp). Elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně 30 minut až 1 hodinu při napětí 100 V, v pufru 0,5krát TBE. Gel byl obarven ve vodném roztoku ethidium bromidu (10  $\mu$ g/ml) a fragmenty DNA byly vizualizovány pomocí UV-transluminátoru (Sigma, St.Louis, MO, USA). Výsledek byl dokumentován pomocí dokumentačního systému Kodak EDAS 290 (dodává KRD s.r.o., Praha, ČR).

PCR reakce probíhaly v PCR termocycleru GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA).

Chemikálie byly zakoupeny pokud není uvedeno jinak od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR), Taq Purple polymerase a pufr pro PCR byly od firmy Top-Bio s.r.o. (Praha, ČR), dATP, dTTP, dGTP, dCTP, restriční endonukleasy, marker molekulových hmotností Phi 174/HaeIII (produkty firmy New England Biolabs dodávané Biotech s.r.o., Praha, ČR), oligonukleotidové primery a agaróza pro elektroforézu (dodává KRD s.r.o., Praha, ČR). Elektroforéza nukleových kyselin byla prováděna na horizontálních přístrojích od firmy Jordan Scientific Inc. JS (dodává Biotech s.r.o., Praha, ČR) a zdrojích proudu EC-105 (dodavatel KRD s.r.o., Praha, ČR).

#### **4.5.3. Restriční analýzy fragmentů (RFLP -restriction fragment length polymorphism)**

U této metody se používají specifické restriční endonukleasy, které rozeznávají určitou sekvenci bází (většinou čtyři až osm deoxyribonukleotidů). Mutací v molekule DNA dojde ke změně cílové sekvence restričního enzymu, který pak buď štěpí nebo naopak neštěpí PCR produkt.

##### Obecné podmínky pro restriční analýzu

- celkový objem 20  $\mu$ l
- restriční pufr 2  $\mu$ l/vzorek (různé složení dle použitého enzymu)
- restriční enzym 1-4 U/vzorek
- délka trvání 2 hodiny při 37 °C

výjimkou je analýza: GSTP1 - 2 hodiny při 55 °C a CYP1B1-kodon 432 - 4 hodiny při 37 °C

##### Kontrola produktů po restriční analýze

Výsledek restriční analýzy byl analyzován pomocí horizontální elektroforézy v 3% agarózovém gelu. Na gel bylo nanášeno celých 20  $\mu$ l restriční směsi. K určení velikosti jednotlivých fragmentů DNA byl použit marker Phi174/HaeIII. Výsledné gely byly barveny ve vodném roztoku ethidium bromidu (10  $\mu$ l/ml) a dokumentovány systémem Kodak EDAS 290. Poté byl stanoven genotyp jednotlivých vzorků: normální homozygot, heterozygot a variantní homozygot.



#### 4.5.4. Podrobné podmínky analyzování jednotlivých genotypů

##### Genotypování CYP1B1

Primery použité pro PCR reakci

1B1-F (forward): CAG GCA GAA TTG GAT CAG GT

1B1-R (reverse): TTT GGA CAG CAC TAT CAA GGA G

Podmínky amplifikace:

- koncentrace  $MgCl_2$  : 1,6 mM
- program: 1' 94 °C // 35 cyklů: 30'' 94 °C / 30'' 65 °C / 30'' 72 °C // 5' 72 °C // 10 °C navždy

Získaný fragment měl velikost 536 bp. Před restrikcí byl celkový objem rozdělen na dvě poloviny. U CYP1B1 se stanovují dva polymorfismy, v kodonu 432 a kodonu 453.

Podmínky restrikce:

a) CYP1B1-kodon 432

- o 4 U/vzorek restrikčního enzymu OsiI
- o restrikční pufr R
- o délka restrikce 4 hodiny při 37 °C

Hodnocení genotypu ve 3% gelu - velikost fragmentů:

- 1) normální homozygot (Leu432Leu) – 308+228 bp
- 2) heterozygot (Leu432Val) – 536+308+228 bp
- 3) variantní homozygot (Val432Val) – 536 bp

b) CYP 1B1-kodon 453

- o 2U/vzorek restrikčního enzymu MwoI1
- o restrikční pufr Tango
- o délka restrikce 2 hodiny při 37 °C

Hodnocení genotypu ve 3% gelu - velikost fragmentů:

- 1) normální homozygot (Asn453Asn) - 392 bp
- 2) heterozygot (Asn453Ser)– 392+248+144 bp

3) variantní homozygot (Ser453Ser) – 248+144 bp

### Genotypování NQO1

Primery použité pro PCR reakci

NQO-F (forward): GTA TCC TCA GAG TGG CAT TC

NQO-R (reverse): TCT CCT CAT CCT GTA CCT CT:

Podmínky amplifikace:

- koncentrace  $MgCl_2$  : 1,8 mM
- program: 1' 94 °C // 15 cyklů: 30'' 94 °C / 30'' 62-47 °C (pokles o 1 °C v každém cyklu) / 30'' 72 °C // 20 cyklů: 30'' 94 °C / 30'' 52 °C / 30'' 72 °C // 5' 72 °C / 10' 0 c navždy

Získaný fragment měl velikost 233 bp.

Podmínky restrikce:

- o 1U/vzorek restrikčního enzymu HinfI
- o restrikční pufr 2
- o délka restrikce 2 hodiny při 37 °C

Hodnocení genotypu ve 3% gelu - velikost fragmentů:

- 1) normální homozygot (Pro187Pro)- 233 bp
- 2) heterozygot (Pro187Ser)– 233+198 bp
- 3) variantní homozygot (Ser187Ser) –198+35 bp

### Genotypování EPHX1

a) exon 3

Primery použité pro PCR reakci

EPHX3-F (forward): GAT CGA TAA GTT CCG TTT CAC C

EPHX3-R (reverse): AAT CTT AGT CTT GAA GTG AGG AT:

Podmínky amplifikace:

- koncentrace  $MgCl_2$  : 1,8 mM
- program: 1' 94 °C // 35 cyklů: 30'' 94 °C / 1'30'' 56 °C / 30'' 72 °C // 5' 72 °C / 10' 0 C navždy

- Získaný fragment měl velikost 163 bp.

Podmínky restrikce:

- o 2 U/vzorek restrikčního enzymu EcoRV
- o restrikční pufr 3
- o BSA-0,2  $\mu$ l/vzorek
- o délka restrikce 2 hodiny při 37 °C

Hodnocení genotypu ve 3% gelu - velikost fragmentů:

- 1) normální homozygot (Tyr113Tyr)– 140 bp
- 2) heterozygot (Tyr113His)– 163+140 bp
- 3) variantní homozygot (His113His) –163 bp

b) exon 4

Primery použité pro PCR reakci

EPHX4-F (forward): ACA TCC ACT TCA TCC ACG T

EPHX4-R (reverse): ATG CCT CTG AGA AGC CAT

Podmínky amplifikace:

- koncentrace MgCl<sub>2</sub> : 1,8 mM
- program: 1' 94 °C // 35 cyklů: 30'' 94 °C / 1'30'' 60 °C / 30'' 72 °C // 5' 72 °C / 10' 0 °C  
navždy

Získaný fragment měl velikost 210 bp.

Podmínky restrikce:

- o 2 U/vzorek restrikčního enzymu RsaI
- o restrikční pufr Y<sup>+</sup>/Tango
- o délka restrikce 2 hodiny při 37 °C

Hodnocení genotypu ve 3% gelu - velikost fragmentů:

- 1) normální homozygot (His139His)–210 bp
- 2) heterozygot (His139Arg)– 210+164 bp
- 3) variantní homozygot (Arg139Arg) –164 bp

Aktivita EPHX1 se určuje se z kombinací určených genotypů EPHX1 v exonu 3 a 4.(viz tabulka č.6)

**Tabulka č. 6: určování aktivity EPHX1**

aktivita EPHX1	genotyp-exon 3	genotyp-exon 4
<b>nízká</b>	*3/*3	*1/*1
	*3/*3	*1/*4
	*1/*3	*1/*1
	*3/*3	*4/*4
<b>střední</b>	*1/*1	*1/*1
	*1/*3	*1/*4
	*1/*3	*4/*4
<b>vysoká</b>	*1/*1	*4/*4
	*1/*1	*1/*4

### Genotypování GSTM1

Toto stanovení se provádí jako alel-specifické PCR a jako pozitivní standard se používá fragment GSTM2 jehož přítomnost signalizuje, že PCR proběhlo v pořádku a absence fragmentu GSTM1 indikuje přítomnost delece genu v homozygotním stavu. Naopak přítomnost fragmentu GSTM1 znamená, že sledovaný jedinec má k dispozici aspoň jednu funkční alelu GSTM1. Stanovení není schopné rozlišit normální homozygoty od heterozygotů.

Primery použité pro PCR reakci

GSTM1-F (forward) CTG CCC TAC TTG ATT GAT G (slouží jako GSTM2-F )

GSTM1-R (reverse): CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC

GSTM2-R (reverse): GAC TCA CTC TGA GCA TAG CAC

Podmínky amplifikace:

- koncentrace MgCl<sub>2</sub> : 1,8 mM
- 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 navždy

Získaný produkt GSTM1 byl velikosti 275 bp, GSTM2 byl 175 bp.

Produkty se dále neštěpily, aplikovaly se přímo na gel.

Hodnocení genotypu ve 3% gelu - velikost fragmentů:

- 1) normální homozygot nebo heterozygot (GSTM1-plus) –275 bp (GSTM1) a 175 bp (GSTM2)
- 2) variantní homozygot (GSTM1-null)– produkt GSTM1 nevzniká a 175 bp (GSTM2)

### Genotypování GSTT1 a GSTP1

Delece genu GSTT1 a jednotlivé genotypy GSTP1 byly stanovovány zároveň. Přítomnost fragmentu GSTP1 sloužila jako pozitivní standard pro případ absence fragmentu GSTT1. Po provedení PCR reakce bylo aplikováno 8  $\mu$ l produktu na gel a byla určena delece genu GSTT1. Poté následovala restrikce a byly určeny genotypy GSTP1.

Primery použité pro PCR reakci

GSTP1-F (forward): TCC TTC CAC GCA CAT CCT CT

GSTP1-R (reverse): AGC CCC TTT CTT TGT TCA GC

GSTT1-F (forward): TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC

GSTT1-R (reverse): TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA

Podmínky amplifikace:

- koncentrace  $MgCl_2$  : 0,8 mM
- program: 1' 94 °C // 35 cyklů: 30" 94 °C / 30" 54 °C / 30" 72 °C // 5' 72 °C / 10' 0 C navždy

Hodnocení genotypu GSTT1 ve 3% gelu.-velikost fragmentů

- 1) normální homozygot nebo heterozygot (GSTT1-plus)- 480 bp
- 2) variantní homozygot (GSTT1-null)- nevytvořil se PCR produkt

Podmínky restrikce:

- o 2U/vzorek restrikčního enzymu BsmAI
- o restrikční pufr 3
- o délka restrikce 2 hodiny při 55 °C

Hodnocení genotypu GSTP1 ve 3% gelu - velikost fragmentů:

- 1) normální homozygot (Ile105Ile)- 294 bp
- 2) heterozygot (Ile105Val)- 294+234, 60 bp
- 3) variantní homozygot (Val105Val) - 234+ 60 bp

### Genotypování GSTM3

Primery použité pro PCR reakci

GSTM3-F (forward): TCA TGG TTT GCC GGG GAA

GSTM3-R (reverse): GGA ACT CAT CCA GGC ACT TG

Podmínky amplifikace:

- koncentrace MgCl<sub>2</sub> : 1,5 mM
- program: 1' 94 °C // 10 cyklů: 30'' 94 °C / 1' 60-50 °C (pokles o 1 °C v každém cyklu)  
/ 30'' 72 °C // 25 cyklů: 30'' 94 °C / 30'' 52 °C / 30'' 72 °C // 5' 72 °C / 10' 0 °C navždy

Získaný fragment měl velikost 189 bp.

Podmínky restrikce:

- o 2 U/vzorek restrikčního enzymu EamI
- o restrikční pufr Tango
- o délka restrikce 2 hodiny při 37 °C

Hodnocení genotypu ve 3% gelu - velikost fragmentů:

- 1) normální homozygot (\*A/\*A) –153 bp
- 2) heterozygot (\*A/\*B)– 189+153 bp
- 3) variantní homozygot (\*B/\*B) –189 bp

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Statistické analýzy

Pro účely statistických analýz byli nekuřáci označeni “0”, zatímco kuřáci “1”. Ženy byly označeny “1” a muži “0”. Nositelé divokého genotypu byli označeni “1”, heterozygoti “2” a nositelé variantního genotypu “3”. Chromosomální aberace byly vyjádřeny jako spojitě hodnoty. Za účelem zvýšení statistické síly studie byli jedinci rovněž rozděleni na nositele divokého genotypu a nositele aspoň jedné variantní alely (tj. variantní homozygoti plus heterozygoti). Kombinace genotypů byly složeny pouze z frekventních polymorfismů tak aby proti sobě byly testovány hypotézy pozitivních vs negativních kombinací (např.: GSTM1-plus + GSTT1-plus vs GSTM1-null + GSTT1-null). Statistické analýzy byly provedeny pomocí základních testů deskriptivní statistiky (např.: crosstabs), analýzy variance ANOVA, jednoduché lineární regrese a multifaktoriální analýzy variance MANOVA pomocí programu SPSS v 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Jako významná byla hodnocena odchylka na hladině  $P < 0.05$ . Korekce na mnohočetné testování nebyly aplikovány, protože všechny testy ověřovaly předem stanovenou hypotézu (negativní vs pozitivní genotyp nebo kombinace genotypů). V případě, že počet jedinců ve skupině byl méně než 40 byl použit Fisherův exact test.

### 5.2. Porovnání frekvence variantních alel u populace studované v této práci s populací České republiky

Na začátku zpracování výsledků studie bylo třeba validovat metodiky sledování genetických polymorfismů biotransformačních enzymů. Za tímto účelem bylo provedeno srovnání frekvencí polymorfismů u sledované populace (tabulka č.7) se známými údaji získanými studiem populace České republiky (tabulka č.8) a s literárními údaji o dalších

evropských populacích. Frekvence variantních alel v *CYP1B1*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTM3* a *NQO1* získané na kontrolní skupině byly srovnány s výsledky publikovanými na české a jiných bělošských populacích [Šarmanová a kol., 2000 a citace tamtéž, Mitrunen a kol., 2001]. Zjištěné frekvence variantních alel sledovaných biotransformačních enzymů byly v rozmezí frekvencí popsanych u jiných bělošských populací. Frekvence se podle očekávání výrazně lišily od frekvencí zjištěných u populace černošské a asijské. Uvedené výsledky jsou v souladu s údaji z literatury, kde byl popsán výrazný rozdíl ve frekvencích polymorfismů mezi populacemi [Vineis, 1999].

**Tabulka č.7: Rozdělení genotypů v populaci studované v této práci.**

<b>Gen</b>	<b>normální typ</b>	<b>heterozygot</b>	<b>variantní typ</b>	<b>frekvence variantní alely</b>
CYP1B1, 432 (Val→ Leu)	Val/Val 156	Val/Leu 211	Leu/Leu 70	0,40
CYP1B1, 453 (Asn→ Ser)	Asn/Asn 303	Asn/Ser 117	Ser/Ser 17	0,17
EPHX1, 113 (Tyr→ His)	Tyr/Tyr 191	Tyr/His 149	His/His 93	0,38
EPHX1, 139 (His→ Arg)	His/His 300	His/Arg 113	Arg/Arg 20	0,18
NQO1, 187 (Pro→ Ser)	Pro/Pro 296	Pro/Ser 125	Ser/Ser 15	0,18
GSTM3, intron 6 del 3bp	A/A 326	A/B 99	B/B 13	0,14
GSTP1, 105 (Ile→ Val)	Ile/Ile 185	Ile/Val 220	Val/Val 35	0,33
GSTM1 (deletion)	plus 230	-	null 212	0,48
GSTT1 (deletion)	plus 339	-	null 100	0,22



**Tabulka č.8: Rozdělení genotypů v populaci České republiky studované dříve.**

Gen	normální typ	heterozygot	variantní typ	frekvence variantní alely
CYP1B1, 432 (Val→ Leu)	Val/Val 117	Val/Leu 149	Leu/Leu 56	0.41*
CYP1B1, 453 (Asn→ Ser)	Asn/Asn 297	Asn/Ser 116	Ser/Ser 17	0.15*
EPHX1, 113 (Tyr→ His)	Tyr/Tyr 165	Tyr/His 163	His/His 70	0.38**
EPHX1, 139 (His→ Arg)	His/His 265	His/Arg 118	Arg/Arg 21	0.20**
NQO1, 187 (Pro→ Ser)	Pro/Pro 221	Pro/Ser 83	Ser/Ser 6	0.15**
GSTM3, intron 6 del 3bp	A/A 199	A/B 59	B/B 8	0.14*
GSTP1, 105 (Ile→ Val)	Ile/Ile 203	Ile/Val 162	Val/Val 41	0.30**
GSTM1 (deletion)	plus 199	-	null 205	0.51**
GSTT1 (deletion)	plus 342	-	null 67	0.16**

\* Jiří Hodis, diplomová práce, 2005

\*\* Šarmanová a kol. 2000

Porovnání distribuce aktivit EPHX1 předpovězených na základě kombinace obou sledovaných polymorfismů u populace studované v této práci ukázalo srovnatelné výsledky jako u dříve studované populace České republiky (tabulka č.9).

**Tabulka č.9: Rozdělení fenotypů EPHX1 ve sledované populaci a v populaci České republiky.**

aktivita EPHX1	Šarmanová et al. 2004		tato práce	
	počet	%	počet	%
nízká	162	44	198	45
střední	169	43	181	42
vysoká	52	13	57	13

Po tomto ověření kvality zpracování souboru byly zjištěné frekvence alel biotransformačních enzymů dále využity ke studiu vztahu individuální vnímavosti a genotoxicity.

### 5.3. Výsledky analýz vztahů mezi individuální vnímavostí a chromosomálními aberacemi jako markerem genotoxicity

#### 5.3.1. Jednotlivé polymorfismy a celkové chromosomální aberace

Souhrnné výsledky statistických analýz vztahu jednotlivých polymorfismů k celkovému počtu CA jsou uvedeny v tabulce 10. Hlavní výstup z analýzy variance (ANOVA) je vyznačen tučně v tabulce s nadpisem ANOVA.

**Tabulka č. 10. Výsledky analýz vztahů mezi individuální vnímavostí a chromosomálními aberacemi**

##### A. CYP1B1-kodon 432 vs celkové CA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Val/Val	137	1,51	1,261	,108	1,30	1,72
Val/Ser	189	1,48	1,453	,106	1,27	1,68
Ser/Ser	61	1,56	1,385	,177	1,20	1,91
Total	387	1,50	1,374	,070	1,36	1,64

##### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	<b>,324</b>	<b>2</b>	<b>,162</b>	<b>,085</b>	<b>,918</b>
Within Groups	728,426	384	1,897		
Total	728,749	386			

##### B. CYP1B1-kodon 453 vs celkové CA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Asn/Asn	273	1,54	1,374	,083	1,37	1,70
Asn/Ser	98	1,30	1,186	,120	1,06	1,53
Ser/Ser	16	2,13	2,125	,531	,99	3,26
Total	387	1,50	1,374	,070	1,36	1,64

##### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	<b>10,735</b>	<b>2</b>	<b>5,367</b>	<b>2,871</b>	<b>,058</b>
Within Groups	718,015	384	1,870		
Total	728,749	386			

**C. NQO1-kodon 187 vs celkové CA**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Pro/Pro	264	1,50	1,409	,087	1,33	1,67
Pro/Ser	106	1,55	1,346	,131	1,29	1,81
Ser/Ser	15	1,33	,976	,252	,79	1,87
Total	385	1,50	1,375	,070	1,37	1,64

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	<b>,650</b>	<b>2</b>	<b>,325</b>	<b>,171</b>	<b>,843</b>
Within Groups	725,594	382	1,899		
Total	726,244	384			

**D. aktivita EPHX1 vs celkové CA**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
nížká	170	1,58	1,379	,106	1,37	1,79
střední	164	1,35	1,237	,097	1,16	1,54
vysoká	52	1,69	1,721	,239	1,21	2,17
Total	386	1,50	1,376	,070	1,36	1,64

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	<b>6,588</b>	<b>2</b>	<b>3,294</b>	<b>1,748</b>	<b>,176</b>
Within Groups	721,912	383	1,885		
Total	728,500	385			

**E. GSTP1-kodon 105 vs celkové CA**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Ile/Ile	162	1,48	1,315	,103	1,27	1,68
Ile/Val	199	1,48	1,414	,100	1,28	1,67
Val/Val	30	1,73	1,388	,253	1,22	2,25
Total	391	1,50	1,370	,069	1,36	1,63

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	<b>1,828</b>	<b>2</b>	<b>,914</b>	<b>,486</b>	<b>,616</b>
Within Groups	729,916	388	1,881		
Total	731,744	390			

**E. GSTM1-delece vs celkové CA**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
GSTM1-plus	199	1,36	1,234	,087	1,18	1,53
GSTM1-null	192	1,64	1,487	,107	1,43	1,85
Total	391	1,50	1,370	,069	1,36	1,63

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	<b>7,873</b>	<b>1</b>	<b>7,873</b>	<b>4,231</b>	<b>,040</b>
Within Groups	723,871	389	1,861		
Total	731,744	390			

**F. GSTT1-delece vs celkové CA**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
GSTT1-plus	262	1,57	1,281	,079	1,42	1,73
GSTT1-null	129	1,34	1,528	,135	1,07	1,61
Total	391	1,50	1,370	,069	1,36	1,63

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	<b>4,630</b>	<b>1</b>	<b>4,630</b>	<b>2,477</b>	<b>,116</b>
Within Groups	727,114	389	1,869		
Total	731,744	390			

**G. GSTM3-intron 6 vs celkové CA**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
*A/*A	295	1,53	1,352	,079	1,38	1,69
*A/*B	83	1,41	1,457	,160	1,09	1,73
*B/*B	9	1,33	1,414	,471	,25	2,42
Total	387	1,50	1,374	,070	1,36	1,64

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	<b>1,233</b>	<b>2</b>	<b>,616</b>	<b>,325</b>	<b>,722</b>
Within Groups	727,516	384	1,895		
Total	728,749	386			

### 5.3.2. Jednotlivé polymorfismy a hlavní typy chromosomálních aberací

Kromě celkových chromosomálních aberací byly sledovány rovněž chromatidové a chromosomové typy aberací. Tyto parciální analýzy přinesly jediný zajímavý výsledek – vztah mezi polymorfismem v kodonu 453 CYP1B1 a chromosomovým typem CA (CSA) na hranici významnosti ( $P = 0.071$ , tabulka č.11).

**Tabulka č. 11. Analýza vztahů mezi polymorfismem v CYP1B1-kodon 453 a chromosomovým typem aberací (CSA)**

#### CYP1B1-kodon 453 vs CSA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Asn/Asn	273	,88	1,228	,074	,74	1,03
Ser/Ser	16	1,50	2,477	,619	,18	2,82
Total	289	,92	1,328	,078	,76	1,07

#### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	<b>5,758</b>	<b>1</b>	<b>5,758</b>	<b>3,290</b>	<b>,071</b>
Within Groups	502,249	287	1,750		
Total	508,007	288			

### 5.3.3. Kombinace polymorfismů a celkové chromosomální aberace

Dále byly hodnoceny kombinace polymorfismů zkonstruované na základě frekvence polymorfismů tak aby v každé skupině byl ze statistického hlediska rozumný počet jednotlivců. Tyto kombinace byly rovněž složeny tak aby byla testována varianta s předpokládanou normální funkcí proti negativní kombinaci, tj. aspoň jedna variantní alela v obou sledovaných polymorfismech. Testovány byly následující kombinace:

GSTM1 + GSTT1

GSTM1 + GSTP1

GSTM1 + NQO1

GSTM1 + EPHX1

Jedinou vícegenovou kombinací, která byla testována byla GSTM1 + GSTP1 + GSTT1. Ze všech testovaných kombinací byl získán jediný statisticky významný výsledek u kombinace GSTM1-null + nízká aktivita EPHX1, která jedinec významně predisponovala ke vzniku větší frekvence celkových CA ( $P = 0.033$ , tabulka č.12).

**Tabulka č. 12. Vztah mezi kombinací GSTM1, aktivitou EPHX1 a chromosomálními aberacemi**

**GSTM1-delece + aktivita EPHX1 vs celkové CA**

	N	Hodnota	Standardní odchylna	Standardní chyba	95% konfidenční interval	
		CA			Lower Bound	Upper Bound
GSTM1-plus + EPHX1-medium	85	1,24	1,260	,137	,96	1,51
GSTM1-null + EPHX1-low	83	1,70	1,528	,168	1,37	2,03
Total	168	1,46	1,414	,109	1,25	1,68

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	<b>9,022</b>	<b>1</b>	<b>9,022</b>	<b>4,611</b>	<b>,033</b>
Within Groups	324,764	166	1,956		
Total	333,786	167			

Z ostatních testovaných kombinací na hranici významnosti korelovala s výskytem celkových CA ještě kombinace GSTM1-null + aspoň jedna variantní alela v NQO1 (tabulka č.13).

**Tabulka č. 13. Vztah mezi kombinací GSTM1, NQO1 a chromosomálními aberacemi**

**GSTM1-delece + NQO1-kodon 187 vs celkové CA**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
		CA				
GSTM1-plus + NQO1-Pro/Pro	131	1,37	1,236	,108	1,16	1,59
GSTM1-null + NQO1-Pro/Ser+Ser/Ser	55	1,75	1,350	,182	1,38	2,11
Total	186	1,48	1,279	,094	1,30	1,67

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	<b>5,343</b>	<b>1</b>	<b>5,343</b>	<b>3,309</b>	<b>,071</b>
Within Groups	297,108	184	1,615		
Total	302,452	185			

**5.3.4. Vliv věku, pohlaví a kouření**

Testem multiple variance analysis (MANOVA) a multifaktoriální regresí byl testován vliv nám dostupných charakteristik souboru, tj. věku, pohlaví a kouření jako hlavního možného konfounderu. Uvedené analýzy neukázaly významný efekt těchto faktorů na nalezené vztahy mezi polymorfismy a chromosomálními aberacemi.

## 6. DISKUSE

### 6.1. Souvislost delece GSTM1 genu s frekvencí chromosomálních aberací

V této práci byly studovány biotransformační enzymy, které participují na detoxikačních reakcích enviromentálních polutantů a řady dalších xenobiotik, jejichž působení může být lidský organismus vystaven např. v zaměstnání.

Společným problémem řady starších studií publikovaných v odborné literatuře je malá velikost sledovaného souboru. Tento fakt je způsoben nikoliv chybným designem studií, ale skutečností, že populací exponovaných dobře definovaným chemickým látkám (tj. především u pracovníků některých průmyslových odvětví), u nichž lze spolehlivě měřit jak koncentrace v prostředí tak i látky a jejich metabolity v krvi či moči, ubývá. Naopak se zdokonalením monitoringu je více než jasné, že velmi podobným látkám jako v průmyslu (polycyklické aromáty, arylaminy, nitrosaminy, polychlorované bifenyly, rozpouštědla) jsou lidé exponováni ve svém, znečištěném, životním prostředí. Z tohoto důvodu se v poslední době provádí sledování parametrů genotoxicity a vnímavosti u neselektovaných populací, především z velkoměst, případně srovnání s méně exponovanými (podle předpokladu) venkovskými populacemi. Presentovaná studie patří právě mezi tento typ studií. Nicméně z důvodu absence relevantních informací v literatuře a pro pochopení mechanistických závislostí budou výsledky diskutovány rovněž v kontextu se studii na sice malých vzorcích populace, avšak exponovaných modelovým genotoxickým látkám jako jsou styren či butadien.

Nejzajímavějším nálezem této práce je významně vyšší frekvence nejdůležitějších markerů genotoxicity (CA) u jedinců s delecí genu GSTM1. U skupiny jedinců, kteří expimovali gen GSTM1 byla frekvence CA 1,36 v porovnání se skupinou s delecí (1,64;



$P=0,04$ ). Toto zjištění je v souladu se závěrem studie z roku 2001. V této studii byl prezentován vliv delece GSTM1 na zvýšení frekvence CA u kuřáků [Norppa a kol., 2001]. Vliv tohoto genotypu byl také prokázán ve studii z roku 2002. Sledována byla indukce záměny sesterských chromatid (SCE). Studie byla prováděna *in vitro* působením styrenu na kultury lymfocytů, izolovaných z lidské krve. Studovány byly geny pro GSTM1 a GSTT1. Experimenty probíhaly s dvěma různými koncentracemi styrenu (1,5 a 0,5 mM). Při působení 1,5 mM styrenu bylo množství indukovaných SCE/buňku vyšší u nositelů GSTM1-null genotypu ( $P=0,011$ ). Vyšší frekvence byla zaznamenána též u jedinců s delecí obou genů (GSTM1 i GSTT1) ( $P=0,015$ ). Při použití nižší koncentrace styrenu nebyly zaznamenány mezi GSTM1-null a GSTM1-plus výrazné rozdíly [Bernardini a kol., 2002].

V další studii byly používány vzorky od osob exponovaných BD. Vedle SCE byly sledovány také adukty hemoglobinu, konkrétně THBVal adukty. Jejich množství se výrazně nelišilo (GSTM1-plus, 74,0 pmol/g globinu; GSTM1-null, 72,8 pmol/g globinu) ( $P=0,89$ ). Frekvence SCE se také nelišila v závislosti na genotypu GSTM1. Ovšem výrazný rozdíl byl nalezen u skupiny s delecí genu GSTT1. SCE byly mnohem více zastoupeny u nositelů genotypu GSTT1-null (138,9 SCE/buňku) oproti nositelům GSTT1-plus (86,2 SCE/buňku;  $P<0,0001$ ). Tato studie byla však provedena na poměrně malém souboru osob ( $n=41$ ), což mohlo snížit objektivitu stanovení [Hayes a kol., 2000]. Studie publikovaná v roce 2002 sledovala opět THBVal adukty u pracovníků exponovaných BD. Nebyl zde nalezen žádný významný rozdíl v množství Hb aduktů mezi skupinou exponovaných jedinců a skupinou kontrolní. Vyšší množství Hb aduktů však bylo zaznamenáno u jedinců z exponované skupiny, kteří byli nositeli delece genu GSTM1 ( $P=0,017$ ) [Fustioni a kol., 2002]. Další studie sledovala vznik mikrojader jako jednoho z biomarkerů genotoxicity v lymfocytech vystavených působení styren-7,8-oxidu *in vitro*. Tyto lymfocyty byly izolovány z krve zdravých jedinců. Studie neprokázala vliv delece GSTM1 genu na frekvenci mikrojader,

protože výsledek byl na hranici statistické významnosti ( $P \leq 0,05$ ). Opět se jednalo o poměrně malou populaci ( $n=30$ ), což mohlo ovlivnit výsledek [Laffon a kol., 2003].

Vedle biomarkerů získávaných z krevních vzorků jsou ke sledování expozice chemickým látkám používány také vzorky moči. Studie uveřejněná roku 2001 sledovala metabolity styrenu vylučované močí. Stanovováno bylo množství PHEMA metabolitů. Jedinci, kteří byli nositeli funkčního genu GSTM1 vylučovali do moče 5-6krát vyšší množství metabolitů oproti nositelům delece GSTM1 genu. Tento závěr by svědčil o tom, že aktivita genu GSTM1 je zásadní pro detoxikaci styrenu a pro schopnost organismu vyloučit jeho intermediáty z těla ven [De Palma a kol., 2001]. Sledováním PHEMA metabolitů styrenu se zabývala i další studie. Zaměstnanci zde byli ovšem vystaveni kontrolovanému množství styrenu ( $50 \text{ mg/m}^3$ ) po dobu 8 hodin. Závěry této studie potvrdily výsledky předchozí práce publikované De Palmou. U skupiny jedinců s GSTM1-null genotypem bylo nalezeno menší množství metabolitů styrenu v moči ( $P=0,0001$ ) [Haufrond a kol., 2002]. Studie z roku 2004 sledovala další metabolity styrenu v moči – kyseliny mandlovou a fenylglyoxalovou. Skupina exponovaných byla vystavena působení styrenu v zaměstnání v průměru po dobu 12 let. Množství metabolitů bylo u skupiny nositelů delece genu GSTM1 2-krát menší v porovnání se skupinou jedinců, která exprimovala tento gen ( $P<0,05$ ). Toto zjištění bylo v rozporu s předchozími studiemi. Rozdíl mohl být způsoben délkou a typem expozice [Teixera a kol., 2004]. Další studie vedle styrenových metabolitů hodnotila také frekvenci mikrojader a CA. Sledovanou populací byly osoby exponované styrenu v zaměstnání. Frekvence mikrojader byla výrazně vyšší u exponované skupiny v porovnání s kontrolami ( $P<0,001$ ). U jedinců z exponované skupiny, kteří byli nositeli delece genu GSTM1 bylo množství PHEMA nižší ( $P<0,001$ ), oproti nositelům tohoto genu. Nalezené množství chromatidových typů aberací bylo v korelaci s metabolity ( $P<0,05$ ) [Migliore a kol., 2006].

Další studie sledovala frekvenci CA u 82 zaměstnanců exponovaných benzenu a 76 neexponovaných kontrol v souvislosti s polymorfními geny GSTM1, GSTT1, GSTP1 a NQO1. Pracovní expozice byla v rozmezí od 0,014 do 0,743 ppm. U jedinců s delecí GSTM1 a GSTT1 genu a u skupiny nositelů variant v NQO1 byly nalezeny vztahy k zvýšené aneuploidii. Tyto výsledky naznačují vliv polymorfismů v těchto genech na citlivost jednotlivce ke vzniku CA při expozici benzenu [Kim a kol., 2004]. Benzenu jsou lidé exponováni ve velkých městech, protože je obsažen ve výfukových plynech automobilů a v cigaretovém kouři.

V ČR byla frekvence CA sledována u zaměstnanců jaderných elektráren Dukovany (n = 114) a Temelín (n = 123). Zdejší zaměstnanci byli rozděleni do dvou skupin dle možnosti přístupu do monitorované zóny kde byl předpoklad expozice ionizovanému záření, které vyvolává CA. U zaměstnanců temelínské jaderné elektrárny bylo nalezeno  $1,90 \pm 0,95$  % buněk s CA u osob s přístupem do monitorované zóny a  $1,82 \pm 1,19$  % buněk s CA u osob, které do této zóny přístup neměly. V jaderné elektrárně Dukovany byly zjištěné hodnoty mírně vyšší ( $2,39 \pm 1,01$  u osob s přístupem,  $2,33 \pm 1,04$  u osob bez přístupu). Závěrem studie bylo, že asociace mezi dávkami záření a zjištěným množstvím CA nebyla prokázána. Jako možný konfounder CA byl označen polymorfismus v GSTP1 (nikoliv GSTM1 nebo GSTT1, které byly rovněž sledovány) [Šrám a kol., 2006]. Jiná studie uzavřela sledování CA u 3402 dětí konstatováním, že monitorování CA u dětí je možné použít k předpovědi úrovně znečištění ve velkých geografických oblastech [Rossner a kol., 2002].

## 6.2. Delece GSTM1 genu v kombinaci s nízkou aktivitou EPHX1 ve vztahu k frekvenci chromosomálních aberací

Dalším statisticky významným výsledkem této práce byl nález vyšší frekvence CA u skupiny jedinců, kteří byli nositeli kombinace delece genu GSTM1 s nízkou aktivitou EPHX1 ( $P=0,033$ ). Samotná aktivita EPHX1 neměla na CA vliv a tudíž lze konstatovat, že EPHX1 pouze mírně zvyšuje již dříve nalezený efekt GSTM1 (viz. výše).

Naše zjištění ohledně samotné EPHX1 odporuje závěrům studie Georgiadise a kol. [2004]. Tato studie sledovala polymorfismy v genech GSTM1, GSTT1, GSTP1 a EPHX1 u studentů z Atén, kde je značné znečištění ovzduší vlivem automobilových exhalací. Sledovanými parametry genotoxicity byly adukty DNA vztahující se k expozici polycyklickým aromátům a CA. U jedinců s vysokou aktivitou EPHX1 bylo množství sledovaných aduktů nižší v porovnání se skupinou s nízkou a střední aktivitou ( $P=0,025$ ) [Georgiadis a kol., 2004]. Vliv kombinací však bohužel nebyl v této studii důkladně zhodnocen. Na druhou stranu je třeba zdůraznit, že DNA adukty jsou zcela jiným druhem biomarkeru než CA a navíc DNA adukty jsme v naší studii nesledovali. Další studie sledovala u skupiny zaměstnanců exponovaných BD jako biomarker genotoxicity frekvenci mutací v HPRT. 67 % zaměstnanců bylo vystaveno nižší koncentraci BD ( $BD < 150$  ppb) a 33 % vyšší ( $BD > 150$  ppb). U skupiny s vyšší expozicí byla nalezena výrazně vyšší frekvence mutací v HPRT u jedinců s nízkou aktivitou EPHX1 ( $13,95 \pm 2,15 \times 10^{-6}/10^6$  buněk) v porovnání s jedinci s vysokou aktivitou EPHX1 ( $4,41 \pm 1,19 \times 10^{-6}/10^6$  buněk;  $P < 0,05$ ). Autoři studie argumentovali, že geneticky podmíněná aktivita EPHX1 hraje důležitou roli v citlivosti lidského organismu vzhledem k expozici BD [Abdel-Rahman a kol., 2003]. Následující studie byla rovněž provedena na populaci exponované BD. Sledovány byly CA a frekvence mutací v HPRT. Oproti předchozí studii však nebyla souvislost mezi nízkou aktivitou EPHX1 a

zvýšenou frekvencí mutací v HPRT prokázána [Zhang a kol., 2004]. Rozdílnost obou studií tkví zejména v odlišném etnickém složení sledovaných populací. Ve studii Abdel-Rahmana byla populace složena z 31 bělochů, 15 afrických Američanů a 3 Hispánců kdežto ve studii Zhanga šlo o obyvatele Číny (n = 39 exponovaných a 38 kontrol).

Nedávno publikovaná studie sledující jednořetězcové zlomy DNA (SSB), jako časný projev genotoxicity, v souvislosti s polymorfismy GSTM1, GSTT1 a aktivitou EPHX1 přinesla velmi podobné závěry jako naše současná studie. SSB byly nejvíce zastoupeny u jedinců s kombinací nízké aktivity EPHX1 a s delecí genu GSTM1 ( $P < 0,05$ ). Rovněž kombinace nízké aktivity EPHX1 a delece GSTT1 vedla k výrazně vyššímu zastoupení SSB [Naccarati a kol., 2005].

### **6.3. Výsledky na hranici statistické významnosti**

Další výsledky, které byly na hranici významnosti, naznačily možný vliv polymorfismů v CYP1B1 (především v kodonu 453) na frekvenci CA. Během analýz byla nalezena u skupiny variantních homozygotů vyšší frekvence CA ( $P = 0,058$ ). Podrobnější analýza, která sledovala pouze skupinu variantních homozygotů, rovněž naznačila vztah k frekvenci chromosomového typu CA ( $P = 0,071$ ). Další zajímavou kombinací byla delece v GSTM1 s variantním genotypem NQO1, která zvyšovala CA ( $P = 0,071$ ). CYP1B1 je vysoce exprimován v některých typech nádorových buněk a byl v minulosti studován v souvislosti se schopností tvorby DNA aduktů, např.: aktivací polycyklických aromátů nebo estradiolu, avšak jeho vztah k CA dosud nebyl objasněn. Podobně i NQO1 nebyl kromě pracovníků exponovaných benzenu [Kim a kol., 2004] zatím v souvislosti s genotoxicitou polutantů důkladně prostudován.

Naše výsledky tak naznačují, že by bylo vhodné další studie zacílit tímto směrem.

## 7. ZÁVĚR

Diplomová práce si kladla za cíl odpovědět na tři hlavní otázky:

- 1) ovlivňují jednotlivé genetické polymorfismy frekvenci CA jako nejčastěji používaného a nejspolehlivějšího markeru genotoxicity?
- 2) Existují kombinace polymorfismů, které by zvyšovaly riziko vzniku CA (tzv. negativní kombinace)?
- 3) Jsou případně nalezené vztahy ovlivněny základními charakteristikami sledovaného souboru jako jsou věk, pohlaví a kouření?

Na první dvě otázky je možné odpovědět ano a na poslední otázku nikoliv.

**Závěrem lze konstatovat, že delece v genu GSTM1, která způsobuje v homozygotním stavu absenci enzymové aktivity, významně zvyšuje riziko vzniku genotoxického poškození v lymfocytech a to jak samotná tak v kombinaci s nízkou aktivitou EPHX1. Mezi další zajímavé faktory patří gen CYP1B1 a kombinace GSTM1 s NQO1. Tyto polymorfismy je třeba dále studovat. Rovněž je potřeba v dalších studiích odhalit přesný molekulární mechanismus jakým polymorfismy přispívají ke zvýšení genotoxické zátěže u obecné populace a tím i k riziku vzniku nádorových onemocnění.**

## 8. PŘÍLOHY

### 8.1. Složení roztoků použitých při izolaci DNA

#### *Lyzační roztok*

##### Rozpis na 100 ml roztoku:

0,32 M sacharóza	10,95 g
1% Triton	1 ml
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,016 g MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
12 mM Tris pH=7,5	1,2 ml z 1 M Tris pH=7,5

#### *Pufr pro proteinkinázu K*

##### Rozpis na 500 ml roztoku

0,375 M NaCl	10,97 g
0,12 M EDTA pH=8	120 ml z 0,5 M EDTA pH=8

#### Proteinkináza K

20 mg/ml proteinkinázy K v dH<sub>2</sub>O-připravuje se těsně před izolací

#### Extrakční směs

Fenol:chloroform=1:1

### 8.2. Příloha č.1-rozdělení genotypů studované populace

#### CYP1B1-kodon 432

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Val/Val	156	35,3	35,7	35,7
	Val/Ser	211	47,7	48,3	84,0
	Ser/Ser	70	15,8	16,0	100,0
	Total	437	98,9	100,0	
Missing	System	5	1,1		
Total		442	100,0		

#### CYP1B1-kodon 453

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Asn/Asn	303	68,6	69,3	69,3
	Asn/Ser	117	26,5	26,8	96,1
	Ser/Ser	17	3,8	3,9	100,0
	Total	437	98,9	100,0	
Missing	System	5	1,1		
Total		442	100,0		

**EPHX1-aktivita**

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	nizká	198	44,8	45,4	45,4
	středni	181	41,0	41,5	86,9
	vysoká	57	12,9	13,1	100,0
	Total	436	98,6	100,0	
Missing	System	6	1,4		
Total		442	100,0		

**NQO1-kodon 187**

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Pro/Pro	296	67,0	67,9	67,9
	Pro/Ser	125	28,3	28,7	96,6
	Ser/Ser	15	3,4	3,4	100,0
	Total	436	98,6	100,0	
Missing	System	6	1,4		
Total		442	100,0		

**GSTM1-delece**

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	GSTM1-plus	230	52,0	52,0	52,0
	GSTM1-null	212	48,0	48,0	100,0
	Total	442	100,0	100,0	

**GSTT1-delece**

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	GSTT1-plus	302	68,3	68,5	68,5
	GSTT1-null	139	31,4	31,5	100,0
	Total	441	99,8	100,0	
Missing	System	1	,2		
Total		442	100,0		

**GSTP1-kodon 105**

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Ile/Ile	185	41,9	42,0	42,0
	Ile/Val	220	49,8	49,9	91,8
	Val/Val	36	8,1	8,2	100,0
	Total	441	99,8	100,0	
Missing	System	1	,2		
Total		442	100,0		



**GSTM3-intron 6**

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	A/A	326	73,8	74,4	74,4
	A/B	99	22,4	22,6	97,0
	B/B	13	2,9	3,0	100,0
	Total	438	99,1	100,0	
Missing	System	4	,9		
Total		442	100,0		

## 8.2. Příloha č.2-ukázky výsledků genotypování

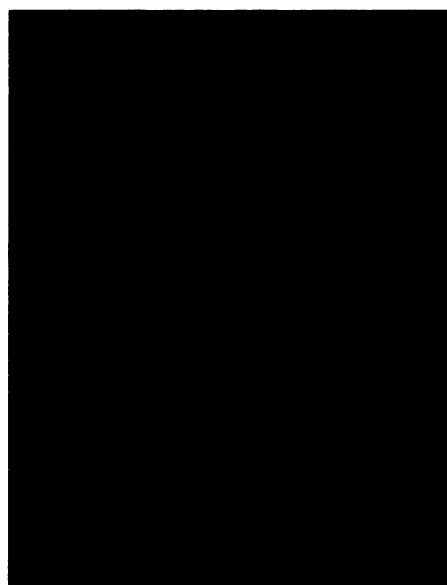
### Ukázka restrikce CYP1B1-kodon 432



1 2 3 4 5 6 7 8

- 1) Marker Phi/174/HaeIII
- 2) Heterozygot (Leu432Val)
- 3) Normální homozygot (Leu432Leu)
- 4) Variantní homozygot (Val432Val)
- 5) Normální homozygot (Leu432Leu)
- 6) Normální homozygot (Leu432Leu)
- 7) Heterozygot (Leu432Val)
- 8) Variantní homozygot (Val432Val)

Ukázka restrikce CYP1B1-kodon 453



1 2 3 4 5 6

- 1) Marker Phi/174/HaeIII
- 2) Normální homozygot (Asn453Asn)
- 3) Normální homozygot (Asn453Asn)
- 4) Variantní homozygot (Ser453Ser)
- 5) Normální homozygot (Asn453Asn)
- 6) Heterozygot (Asn453Ser)

Ukázka restrikce NQO1



- 1) Marker Phi/174/HaeIII
- 2) Normální homozygot (Pro187Pro)
- 3) Heterozygot (Pro187Ser)
- 4) Normální homozygot (Pro187Pro)
- 5) Normální homozygot (Pro187Pro)
- 6) Variantní homozygot (Ser187Ser)

Ukázka restrikce EPHX1

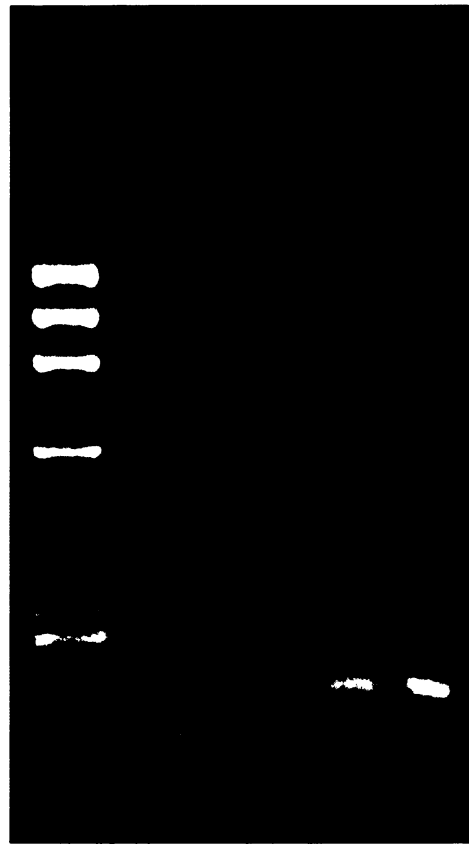
a) exon 3



1 2 3 4 5 6 7 8 9

- 1) Marker Phi/174/HaeIII
- 2) Variantní homozygot (His113His)
- 3) Variantní homozygot (His113His)
- 4) Normální homozygot (Tyr113Tyr)
- 5) Heterozygot (Tyr113His)
- 6) Normální homozygot (Tyr113Tyr)
- 7) Variantní homozygot (His113His)
- 8) Heterozygot (Tyr113His)
- 9) Variantní homozygot (His/His)

b) exon 4



1 2 3 4 5

- 1) Marker Phi/174/HaeIII
- 2) Variantní homozygot (Arg139Arg)
- 3) Heterozygot (His139Arg)
- 4) Normální homozygot (His139His)
- 5) Normální homozygot (His139His)

Ukázka GSTM1



- 1) Marker Phi/174/HaeIII
- 2) Normální homozygot, heterozygot (GSTM1+)
- 3) Normální homozygot, heterozygot (GSTM1+)
- 4) Variantní homozygot (GSTM1-)

Ukázka GSTT1

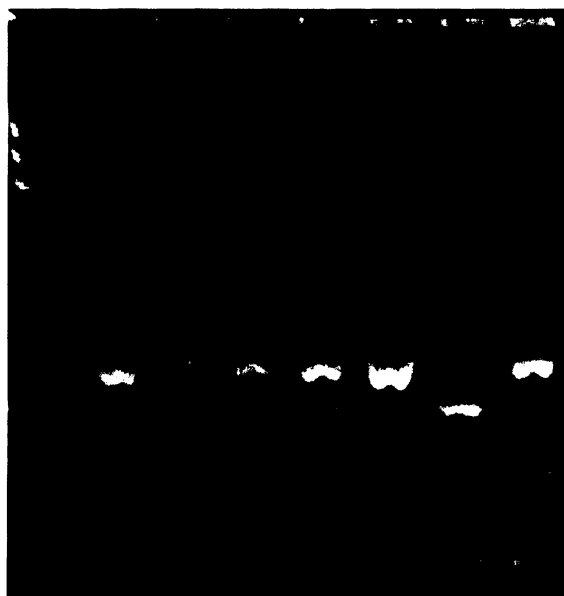


1 2 3 4 5 6 7

- 1) Marker Phi/174/HaeIII
- 2) Normální homozygot, heterozygot (GSTT1+)
- 3) Normální homozygot, heterozygot (GSTT1+)
- 4) Normální homozygot, heterozygot (GSTT1+)
- 5) Variantní homozygot (GSTT1-)
- 6) Variantní homozygot (GSTT1-)
- 7) Variantní homozygot (GSTT1-)



### Ukázka restrikce GSTP1



1 2 3 4 5 6 7 8

- 1) Marker Phi/174/HaeIII
- 2) Heterozygot (Ile105Val)
- 3) Normální homozygot (Ile105Ile)
- 4) Heterozygot (Ile105Val)
- 5) Heterozygot (Ile105Val)
- 6) Heterozygot (Ile105Val)
- 7) Variantní homozygot (Val105Val)
- 8) Heterozygot (Ile105Val)

Ukázka restrikce GSTM3



- 1) Marker Phi/174/HaeIII
- 2) Heterozygot (\*A/\*B)
- 3) Normální homozygot (\*A/\*A)
- 4) Normální homozygot (\*A/\*A)
- 5) Variantní homozygot (\*B/\*B)

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Agalliu I., Langaberg J.W., Lampe J.W., Salinas C.A., Stanford J.L., *The Prostate*, 2006, 66, 146-156.

Ahmad H., Wilson D.E., Fritz R.R., Singh S.V., Medh R.D., Nagle G.T., Awasthi Y.C., Kurosky A., *Arch Biochem Biophys* 1990; 278 (2): 398-408.

Albrecht O.E., Filser J.G., Neumann H.G., Peltonen K., Vainio H., Hemminki K., IARC Scientific Publications, Lyon, 1993, 134-142.

Albertini R.J., Sram R.J., Vacek P.M., Lynch J., Wright M., Nickals J.A., Boogard P.J., Henderson R.F., Swenberg J.A., Tates A.D., Ward J.B. Jr., *Chem Biol Interact*, 2001, 135-136, 429-453.

Ali-Osman, F., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 10004-10012.

Anderson D. *Mutat Res.*, 1998; 405(2),247-58. Review.

Baxter S.W., Choong D.Y.H., Campbell I.G., *Cancer Lett*, 2002, 177, 75-81.

Belinsky M. and Jaiswal A.K., *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12(2): 103-117.

Bernardini S., Hirvonen A., Järventaus H., Norppa H., *Carcinogenesis*, 2002, 23, 893-897.

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

Brockmüller J., Cascorbi I., Kerb R., Roots I., *Cancer Res* 1996; 56: 3915-3925.

Cajas-Salazar N., Au W., Zwischenberger J.B., Sierra-Torres C.H., Salama S.A., Alpard S.K., Tying S.K., *Cancer Gen. And Cytogen.* , 2003, 145, 97-102.

Cochrane J.E., Skopek T.R., *Carcinogenesis*, 1994, 15, 713-717.

Cowell I.G., Dixon K.H., Pemble S.E., Ketterer B., Taylor J.B., *Biochem J* 1988; 255(1): 79-83.

De Palma, Manini P., Mozzoni P., Andreoli R., Bergamaschi E., Cavazzini S., *Chem Res Toxicol*, 2001, 14, 1393-1400.

Elexpuru-Camiruaga J., Buxton N., Kandula V., Dias P.S., Campbell D., McIntosh J., Broome J., Jones P., Inskip A., Aldersea J., *Cancer Res* 1996; 55(19): 4237-4239.

El-Zein R.A., Zwischenberger J.B., Abdel-Rahman S.Z., Sankar A.B., Au W.W., *Cancer Lett* 1997; 112: 71-78.

Fustioni S., Soleo L., Warholm M., Begemann P., Rannug A., Neumann H-G., Swenberg J.A., Vimercati L., Colombi A., *Cancer Epidemiology , Biomark. And Prev.*, 2002, 11, 1082-1090.

Gajecka M., Rydzanicz M., Jaskula-Sztul R., Kujawski M., Szyfter W., Szyfter K., *Mutat Res*, 2005, 574, 112-123.

Georgiadis P., Demopoulos N.A., Topinka J., Stephanou G., Stoikidou M., Bekyrou M., Katsouyianni K., Šrám R., Autrup H., *Tox Lett*, 2004, 149, 269-280.

Guengerich F.P., Kim D.H., Iwasaki M., *Chem Res Toxicol* 1991; 4(2): 168-179.

Harries L.W., Stubbins M.J., Forman D., Howard G.C., Wolf C.R., *Carcinogenesis* 1997; 18(4): 641-644.

Hartus MJ, Coggan M, Langton L, Wilson SR, Board PG, *Pharmacogenetics*, 1998; 8, 27-31.

Hassett C., Robinson K.B., Beck N.B., Omiecinski C.J., *Genomics* 1994-a; 23: 433-442.

Hassett C., Aicher L., Sidhu J.S., Omiecinski C.J., *Hum Mol Genet* 1994-b; 3(3): 421-428.

Haufroid V., Buchet J-P., Gardinal S., Lison D., *Int Arch Environ Health*, 2002, 75, 453-458.

Hayes R.B., Zhang L., Yin S., Swenberg J.A., Xi L., Wiencke J., Bechtold W.E., Rothman N., *Carcinogenesis*, 2000, 21, 55-62.

Hayashi, S. *J. Biochem*, 1991, 110, 407-411.

Hildesheim A., Chen C.J., Caporaso N.E., Cheng Y.J., Hoover R.N., Hsu M.M., Levine P.H., Chen I.H., Chen J.Y., Yang C.S., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4(6): 607-610.

Hirvonen A., Husgafvel-Pursiainen K., Anttila S., Karjalainen A., Vainio H., *Carcinogenesis* 1993; 14(1): 85-88.

Hodis J., *Diplomová práce*, 2005.

Iwahashi, K., 1995, *Clin. Exp. Res*, 19(3), 564-566.

Jackson M.A., Stack H.F., Rice J.M., Waters M.D., *Mutat Research*, 2000, 463, 181-213.

Chao Y.C., Young T.H., Chang W.K., Tang H.S., Hsu C.T., *Hepatology* 1995; 22(5): 1409-1414.

Chen Y., Farmer A.A., Chen C.F., Jones D.C., Chen P.L., Lee W.H., *Cancer Res* 1996;56(14):3168-72.

Chen Y., Farmer A.A., Chen C.F., Jones D.C., Chen P.L., Lee W.H. *Cancer Res*, 1999;56(14):3168-72.

Cheng L., Sturgis E.M., Eicher S.A., Char D., Spitz M.R., Wei Q., *Int. J. Cancer*, 1999, 84, 220-224.

Kano T., Sakai M., Muramatsu M., *Cancer Res* 1987; 47(21): 5626-5630.

Katoh T., Nagata N., Kuroda Y., Itoh H., Kawahara A., Kuroki N., Ookuma R., *Carcinogenesis*. 1996; 17(9): 1855-9.

Kato S., Shields P.G., Caporaso N.E., Sugimura H., Trivers G.E., Tucker M.A., Trump B.F., Weston A., Harris C.C., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3(6): 515-518.

Kelsey K.T., Wiencke L., Ward J., Bechtold W., Fajen J., *Mutat Res*, 1995, 335, 267-273.

Kempkes M., Wiebel F.A., Golka K., Heitmann P., Bolt H.M., *Arch Toxicol* 1996; 70(5):306-309.

Kihara, M., *Carcinogenesis*, 1994, 15(2), 415-418.

Kim S.Y., Choi J.K., Cho Y.H., Chung E.J., Paek D., Chung H.W., *Pharmacogenetics*, 2004, 14(7), 453-463.

Koc H., Tretyakova N.Y., Walker V.E., Henderson R.F., Swenberg J.A., *Chem Res Toxicol*, 1999, 12, 566-574.

Koivisto P., Adler I.D., Sorsa M., Peltonen K., *Environ Health Perspect*, 1996, 104, 655-657.

Koivisto P., Peltonen K., *Chem.-Bio. Interactions*, 2001, 135, 363-372.

Komiya Y., Tsukino H., Nakao H., Kurda Y., Omak H., Katoh T., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2005, 131, 238-242.

Ladero, J.M , 1996, *GUT* , 39(2), 330-333.

Laffon B., Perez-Cadahia B., Pasaro E., Mendez J., *Mut Res*, 2003, 536, 49-59.

Lafuente M.J., Casterad X., Trias M., Ascaso C., Molina R., Ballesta A., Zheng S., Wiencke J.K., Lafuente A., *Carcinogenesis*, 2000, 21, 1813-1819.

Lee E.J., Wong J.Y., Yeoh P.N., Gong N.H., *Pharmacogenetics* 1995; 5(5):332-334.

Lee I.M., *Proc Assoc Am Physicians*. 1997;111(1):10-5.

Lewis S.J., Cherry N.M., Niven R.M., Barber P.V., Povey A.C., *Lung Cancer*, 2001, 34, 177-183.

Liang G., Pu Y., Yin L., *Can Lett*, 2005, 223, 265-274.

Liu S., Park J.Y., Schantz S.P., Stern J.C., Lazaru P., *Oral Oncology*, 2001, 37, 437-445.

London S.J., Daly A.K., Cooper J., Carpenter C.L., Navidi W.C., Ding L., Idle JR. *Pharmacogenetics* 1996; 6(2): 151-158.

Lovregio P., Bukvic N., Fustioni S., Ballini A., Drago I., Guanti G., Soleo L., Arch Toxicol, 2005, 11, 204-207.

Maezawa Y., Yamauchi M., Toda G., . Am J Gastroenterol 1994; 89(4): 561-565.

Masimirembwa C.M., Dandara C., Sommers D.K., Snyman J.R., Hasler J.A., Pharmacogenetics 1998; 8: 83-85.

Matthias C., Bockmuhl U., Jahnke V., Jones P.W., Hayes J.D., Aldersea J., Gilford J., Bailey L., Bath J., Worrall S.F., Hand P., Fryer A.A., Pharmacogenetics 1998-a; 8(2): 91-100.

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 1995; 92: 2384-2387.

Meyer D.J., Coles B., Pemble S.E., Gilmore K.S., Fraser G.M., Ketterer B., Biochem J 1991; 274 (Pt 2): 409-414.

Migliore L., Naccarati A., Coppede F., Bergamaschi E., De Palma G., Voho A., Manini P., Jarventaus H., Mutti A., Norppa H., Hirvonen A., Pharm Genom, 2006, 16(2), 87-99.

Mitrunen K., Jourenkova N., Kataja V., Eskelinen M., Kosma V.M., Benhamou S., Vainio H., Uusitupa M., Hirvonen A., Cancer Epidemiol Biomark Prev, 2001, 10, 229-236.

Morita S., Yano M., Tsujinaka T., Ogawa A., Taniguchi M., Kaneko K., Shiozaki H., Doki Y, Inoue M., Monden M., Int J Cancer, 1998, 79, 517-520.

Naccarati A., Soucek P., Stetina R., Haufroid V., Kumar R., Vodickova L., Trtkova K., Dusinska M., Hemminki K., Vodicka P., Mut Res, 2005, 121-131.

Nakachi K., Imai K., Hayashi S., Watanabe J., Kawajiri K., Cancer Res 1993; 51(19): 5177-5180.

Naoe T., Takeyama K., Yokozawa T., Clin Cancer Res, 2000, 6, 4091-4095.

Nebert, D.W. and Jones, J.E. ,1989, Int. J. Biochem., 21,: 243-252.

Nebert, D.W. ,1991, Mutat. Res, 247, 267-281.

Nebert D.W., Roe A.L., Vandale S.E., Bingham E., Oakley G.G., Genet Med. 2002; 4(2),62-70.

Norppa H., Mut Res, 2001, 544, 339-348.

Osterman-Golkar S., Bond J.A., Ward J.B., Legator M.S., IARC Scientific Publications, Lyon, 1993, 127-134.

Park J.Y., Schantz S.P., Lazaru P., Oral Oncology 2003, 39, 483-490

- Park S.J., Zhao H., Spitz M.R., Grossmann H.B., Wu X., *Mut. Research*, 2003, 536, 131-137
- Pemble S., Schroeder K.R., Spencer S.R., Meyer D.J., Hallier E., Bolt H.M., Ketterer B., Taylor J.B.,  
*Biochem J*, 1994; 300 (Pt 1): 271-276.
- Perez H.L., Lähdetie J., Landin H.H., Kilpelain I., Koivisto P., Peltonen K., Osterman-Golkar S., *Chem-Biol. Interact*, 1997, 105, 181-198.
- Persson I., Johansson I., Bergling H., Dahl M.L., Seidegard J., Rylander R., Rannug A., Hogberg J., Sundberg M.I., *FEBS Lett.* 1993;319(3):207-11.
- Pfaffli P., Hesso A., Vainio H., Hyvönen M., *Toxicol Appl Pharmacol*, 1981, 60, 85-90.
- Pinarbasi H., Silig Y., Cetinkaya O., Seyfikli Z., Pinarbasi E., *Cancer Genet Cytogenet*, 2003, 146, 125-129.
- Pirmohamed M., Kitteringham N.R., Quest L.J., Allott R.L., Green V.J., Gilmore I.T., Park B.K., *Pharmacogenetics* 1995; 5(6): 351-357.
- Rössner, P., *AHEM*, 1989, příloha 20.
- Ryberg D., Skaug V., Hewer A., Phillips D.H., Harries L.W., Wolf C.R., Ogreid D., Ulvik A., Vu P., Haugen A., *Carcinogenesis* 1997; 18(7): 1285-1289.
- Rylander-Rudquist T., Wedren S., Granath, Humphreys K., Ahlberg S., Weiderpass E., Oscarson M., Ingelman-Sundberg M., Persson I., *Carcinogenesis*, 2003, 24(9), 1533-1539.
- Sarbia M., Bitzer M., Siegel D., Ross D., Schulz W.A., Zotz R.B., Kiel S., Geddert H., Kandemir Y., Walter A., Gabbert H., *Int. J. Cancer*, 2003, 107, 381-386.
- Sasaki M., Tanaka Y., Okino S., Nomozo M., Yonezawa S., Nakagawa M., Fujimoto S., Sakuragi N., Dahiya R., *Clin an Res*, 2004, 10, 2015-2019.
- Seidegard, J., *Carcinogenesis*, 1985, 6, 1211-1216.
- Schultz W.A., Krummeck A., Rösinger I., Schmitz-Dräger B.J., Sies H., *Pharmacogenetics* 1998;8: 453-454.
- Siegel D., Ross D., *Free Rad Biol Med*, 2000, 29, 246-253.
- Smith C.A., Harrison D.J., *Lancet* 1997; 350: 630-633.
- Sreeja L., Shamala V., Hariharan S., Madhavan J., Devan S.Ch., Ankathil R., *Journal of Human Genetics*, 2005, 10, 230-244.
- Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E., *Chem listy*, 1999, 93, 229-237.

Sunaga N., Kohno T., Yanagitani N., Sugimura H., Kunitoh H., Tamura T., Takei Y., Tsuchiya S., Saito R., Kokota J., *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 2002, 11, 730-738.

Swenberg J.A., Ham A., Koc H., Morinello E., Ranasinghe A., Tretyakova N., Upton P.B., Wu K-Y., *Mutat Research*, 2000, 464, 77-86.

Swenberg J.A., Christova-Gueorguieva N.I., Upton P.B., Ranasinghe A., Scheller N., Wu K.Y., Health Effects Institute, 2000, 191-209.

Šarmanová, Diplomová práce, 1999.

Šarmanová J, Týnková L, Šušová S, Gut I, and Souček P., (2000), *Pharmacogenetics*, 10, 781-788.

Šrám R.J., Rossner P., Rubes J., Beskid O., Dusek Z., Chvátalová I., Schmutzerová J., Milčová A., Solansky I., Bavorová H., Očadlíková D., Kopečná O., Musilová P., *Mutat Res*, 2006, 593, 50-63.

Terelius, Y. a kol., *Frontiers of Biotransformation* 8, Berlin, Academic Verlag, 1993, 178-232.

Tretyakova N.Y., Lin Y., Sangaiah R., Swenberg J.A., *Carcinogenesis*, 1996, 113, 70-76.

Trizna Z., Clayman G.L., Spitz M.R., Briggs K.L., Goepfert H., *Cancer. Am J Surg* 1995; 170(5): 499-501.

Tsutsumi M., Takada A., Wang J.S., *Gastroenterology* 1994; 107(5): 1430-1435.

Uematsu, F. , *Jpn. J. Cancer Res*, 1991, 82, 254-256.

Urban M., Gilch G., Schepers G., van Miert E., Scherer G., *J.Chromatogr*, 2003, 796, 131-140

Valjus J, Norppa H, Järventaus H, Sorsa M, Nykyri E, Salomaa S, Jarvinen P, Kajander J., 1993, *Radiat Environ Biophys* , 32, 325-336.

Van der Logt E.M.J., Bergevoet S.M., Roelofs H.M.J., Porsche R.H.M., van Dijk Y., Wobbes T., Nagengast F.M., Peters W., *Mut Research* ,2005, 16(5), 201-212.

Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J, Boffetta P, 1999, IARC Scientific Publication no. 148. IARC, Lyon, France.

Vodicka P., Koskinen M., Arand M., Oesch F., Hemminki K., *Mutat Research*, 2002, 511, 239-254.



Vodicka P., Koskinen M., Stetina R., Soucek P., Vodickova L., Matousu Z., Kuricova M., Hemminki K., *Cancer Det. And Prev.*, 2003, 27, 275-284.

Vodicka P., Kumar R., Stetina R., Musak L., Soucek P., Haufroid V., Sasiadek M., Vodickova L., Naccarati A., Sedikova J., Sanyal S., Kuricova M., Brsiak V., Norppa H., Buchancova J., Hemminki K., *Environ. And Mol. Mutat*, 2004, 44, 283-292 .

Warholm M., Alexandrie A.K., Hogberg J., Sigvardsson K., Rannug A., *Pharmacogenetics* 1994; 4(6): 307-311.

Wen Tan, Nan S., Gui-Qi W., Qing L., Kadlubar F., *Cancer Epidemiology*, 2000, 9, 551-556.

Wong N.A.C., Rae F., Simpson K.J., Murray G.D., Harrison D.J., *Clin. Pathol.*, 2000, 53, 88-93.

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

Wu X., Shi H., Jiang H., Kemp B., Hong W.K., Delclos G.L., Spitz M.R., *Carcinogenesis* 1997; 18(5): 967-973.

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

Yamauchi M., Maezawa Y., Mizuhara Y., Ohata M., Hirakawa J., Nakajima H., Toda G. *A Multivariate Analysis. Hepatology*, 1995; 22(4): 1136-1142.

Yim J.J., Yoo C.G., Lee C-T., Kim Y.W., Han S.K., Shim Y.S., *Lung*, 2002, 180, 119-125.

Yin L., Pu Y., Tung Y., *Lung Cancer*, 2001, 33, 133-141.

Yu M.W., Gladek-Yarborough A., Chiamprasert S., Santella R.M., Liaw Y.F., Chen C.J., *Gastroenterology* 1995; 109(4): 1266-1273.

Zhang L., Hayes R.B., Guo W., McHale C., Yin S., Wiencke J.K., O'Neil J.P., Rothman N., Li G-L., Smith M.T., *Mut Res*, 2004, 558, 63-74.

Zhao C., Koskinen M., Hemminki K., *Toxicol Lett*, 1998, 102-103, 591-594.

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

Zhong S., Wyllie A.H., Barnes D., Wolf C.R., Spurr N.K., *Carcinogenesis* 1993; 14(9): 1821-1824.

