

GENETICKÉ POLYMORFISMY BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ A JEJICH SLEDOVÁNÍ V POPULACI ČESKÉ REPUBLIKY

STUDY OF GENETIC POLYMORPHISMS IN BIOTRANSFORMATION ENZYMES IN THE POPULATION OF THE CZECH REPUBLIC

SOUČEK P.¹, ŠARMANOVÁ J.¹, ŠUSOVÁ S.¹, TÝNKOVÁ L.¹, BENEŠOVÁ K.², VODIČKA P.³, GUT I.¹

¹ ODBORNÁ SKUPINA BIOTRANSFORMACÍ, CENTRUM HPNP, STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, PRAHA 10

² I. INTERNÍ KLINIKA, VŠEOBECNÁ FAKULTNÍ NEMOCNICE, U NEMOCNICE 2, PRAHA 2

³ ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY, AKADEMIE VĚD ČR, VÍDEŇSKÁ 1083, PRAHA 4

Souhrn: Genotypování je postup, při kterém je u lidí zjišťována přítomnost dědičných genetických změn v DNA izolované z bílých krvinek. Biotransformační enzymy se účastní metabolismu jak látek vnitřního původu, tak látek cizorodých. Důsledkem polymorfismů biotransformačních enzymů pak mohou být rozdíly v metabolických profilech jednotlivců a především v poměrech mezi detoxikací a aktivací prokarcinogenů. Tento fakt pak naznačuje význam genotypování biotransformačních enzymů pro včasnou diagnostiku zvýšené vnímavosti jedince vůči chemickým karcinogenům. V poslední době byla nalezena celá řada souvislostí mezi výskytem polymorfismů některých biotransformačních enzymů a rozvojem především nádorových onemocnění. V této studii bylo provedeno sledování polymorfismů v cytochromech P450 1A1, 2E1, epoxid hydroláze a třech isoenzymech glutathion S-transferáz u několika skupin české populace: zdravé kontrolní populace, pacientů trpících lymfomy ve srovnání se zdravými kontrolami a pracovníků exponovaných styrenu ve srovnání s neexponovanými jedinci. Výsledky studie naznačují, že polymorfismy biotransformačních enzymů: 1/ jsou zastoupeny ve zdravé české populaci v podobné míře jako u ostatních bělošských ras, 2/ mohou hrát důležitou úlohu v rozvoji lymfomů, 3/ pravděpodobně mají spojitost s genotoxickým působením styrenu u exponovaných osob.

Klíčová slova: genotypování, cytochromy P450, epoxid hydroláza, glutathion S-transferázy, rakovina, lymfomy, expozice, styren

Abstract: Genotyping is used for assessment of hereditary genetic changes in DNA isolated from white blood cells. Biotransformation enzymes take part in metabolism of endogenous substrates and xenobiotics (drugs). As a result of genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, individual metabolic profiles and mainly ratios between detoxification and bioactivation of procarcinogens may be changed. Therefore, genotyping of biotransformation enzymes may be important for early detection of increased individual susceptibility towards chemical carcinogenesis. In the last decade, increasing number of associations between polymorphisms in biotransformation enzymes and individual susceptibility to various diseases and mainly malignant ones was published. Our study was focused to assessment of polymorphisms in cytochromes P450 1A1, 2E1, epoxide hydrase, and three isoenzymes of glutathione S-transferases in several groups of Czech population: healthy control population, case-control study of lymphomas, and workers exposed to styrene in comparison with unexposed individuals. Results suggest that, polymorphisms in biotransformation enzymes: 1/ assessed in healthy Czech subjects show similar frequencies and distribution as data on the majority of European Caucasians, 2/ may play a significant role in etiology of lymphomas, 3/ most probably contribute to genotoxic effects of styrene found in exposed individuals.

Key words: genotyping, cytochromes P450, epoxide hydrolase, glutathion S-transferases, cancer, lymphoma, exposure, styrene

Úvod

Genotypování je postup, při kterém je u lidí zjišťována přítomnost dědičného poškození genů v DNA izolované z bílých krvinek. Pokud je taková genetická vada přítomna ve více než 1% zkoumané populace, je možno mluvit o genetickém polymorfismu. My jsme si ke studiu vybrali nejdéle známé polymorfismy v genech biotransformačních enzymů. Ty jsou také uvedeny v tabulce 1A. Vedle dříve používaného názvu pro mutované alely je uveden i nový návrh zveřejněný v publikaci IARC o polymorfismech metabolizujících enzymů (1). Mutacemi v exonech mohou vznikat geny, jejichž produkty jsou neaktivní nebo mají změněnou substrátovou specifitu. Mutace v přiléhajících oblastech nebo intronech mohou ovlivnit regulaci transkripce nebo sestřih mRNA a mít za následek hyperinducibilitu nebo změny stability proteinu.

Biotransformační enzymy se účastní metabolismu jak látek vnitřního původu, např. hormonů, cholesterolu, žlučových kyselin, tak i cizorodých látek, které kontaminují pracovní a životní prostředí člověka (léčiva, rozpouštědla, produkty spa-

Tabulka 1A. Vybrané polymorfismy biotransformačních enzymů

gen	název alel	poloha polymorfismu	změna aminokyseliny	vliv na expresi proteinu
<i>CYP1A1</i>	<i>m1/m2</i> <i>CYP1A1*1A/*2A</i>	6235 (3'-konec)	–	ne
<i>CYP2E1</i>	<i>c1/c2</i>	-1019 (5'-konec)	–	zvýšení transkripce
	<i>CYP2E1*1A/*5B</i>	7668 (intron 6)	–	ne
	<i>D/C</i> <i>CYP2E1*1A/*6</i>			
<i>EPHX1</i>	<i>Tyr/His</i> <i>EPHX1*1/*2</i>	337 (exon 3)	Tyr → His	nižší aktivita o 50%
	<i>His/Arg</i> <i>EPHX1*1/*3</i>	415 (exon 4)	His → Arg	vyšší aktivita o 25%
<i>GSTM1</i>	<i>plus/null</i> <i>GSTM1*1A/*2</i>	delece	–	ztráta aktivity
<i>GSTP1</i>	<i>Ile/Val</i> <i>GSTP1*1/*2</i>	313 (exon 5)	Ile → Val	vyšší aktivita, afinita/stabilita
<i>GSTT1</i>	<i>plus/null</i> <i>GSTT1*1/*2</i>	delece	–	ztráta aktivity

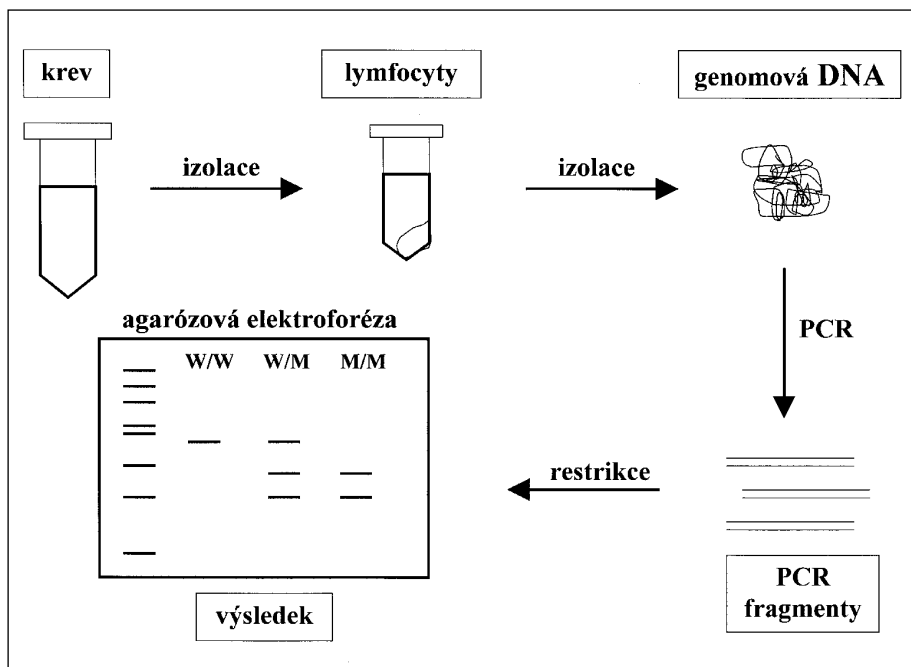
Tabulka 1B. Vlastnosti vybraných biotransformačních enzymů

enzym	hlavní výskyt	variabilita	markerový substrát	metabolismus prokarcinogenů
CYP1A1	plic mikrosomy	100x	PAHs	benzo/a/pyren bifenyly
CYP2E1	játra mikrosomy	20x	chlorzoxazon nitrosaminy	benzen, styren
EPHX1	všechny orgány mikrosomy	50x	styren oxid	benzo/a/pyren
GSTM1	játra cytosol	-	-	monoepoxybutan trans-stilbenoxid
GSTP1	mimo játra cytosol	-	1-chloro-2,4- -dinitrobenzen	dihaloalkeny akrolein
GSTT1	játra cytosol	-	-	dichlormethan ethylenchlorid diepoxybutan

Tabulka 2. Biotransformační enzymy a rakovina

gen	rakovina	populace	rizikový genotyp	statistika OR (P)
CYP1A1	plic tlustého střeva prsu	orientální	*2A/*2A	3.1
		orientální	*2A/*2A	P < 0.01
		černošská	*2A/*2A	9.7
CYP2E1	plic	orientální	*6	P < 0.05
		orientální	*5B/*5B	2.45
	nosohltau	bělošská	*5B	3.5
		orientální	*6/*6	5.0
		orientální	*5B/*5B	7.7
jater	orientální	*5B	P = 0.034	
	bělošská	*5B	P < 0.004	
EPHX1	jater vaječníků	orientální	*2	3.3
		bělošská	*2	2.6
GSTM1	plic	bělošská	null	2.3
		orientální	null	P < 0.01
	moč. měchýře střev	bělošská	null	1.7
		bělošská	null	1.78
		orientální	null	2.03
prsu hlavy a krku	bělošská	null	2.44	
	bělošská	null	2.37	
GSTP1	plic moč. měchýře	bělošská	*2/*2	2.5
		bělošská	*2/*2	3.6
GSTT1	plic střev	bělošská	null	3.4
		bělošská	null	2.35

Obrázek 1. Metodika genotypování



lování benzínu, kouření, alkohol apod., tabulka 1B, viz. přehledný referát 2 a literatura v něm uvedená). Funkce biotransformačních enzymů nejsou nikdy jednoznačně pozitivní či negativní. Některé enzymy se účastní detoxikace a jiné zase naopak metabolické aktivace chemikálií na silně reaktivní produkty schopné poškozovat biomakromolekuly. Důsledkem polymorfismů biotransformačních enzymů pak mohou být rozdíly v metabolických profilech jednotlivců a především v poměrech mezi detoxikací a aktivací prokarcinogenů. Tento fakt pak naznačuje význam genotypování biotransformačních enzymů pro včasnou diagnostiku zvýšené vnímavosti jedince vůči chemické karcinogenezi. Z první fáze biotransformace jsou často studovány cytochromy P450 (CYP): CYP1A1, který metabolizuje aromatické polycyklické uhlovodíky, CYP2E1 metabolizující např. benzen a styren a mikrosomální epoxid hydroláza (EPHX1), která velmi účinně odstraňuje velmi reaktivní arenoxidy. Z druhé fáze pak glutathion S-transferázy (GST), které konjugacemi reaktivních meziproductů metabolismu cizorodých látek umožňují jejich snadné vyloučení z organismu.

V poslední době se mnoho autorů zaměřilo na hledání přímé souvislosti mezi výskytem polymorfismů a rozvojem některých onemocnění, především nádorových (tabulka 2). Byly nalezeny vztahy mezi všemi zkoumanými polymorfismy a celou řadou rakovinných onemocnění. Jednou z hlavních statistických veličin, které se v tomto výzkumu používají, je OR neboli odds ratio - česky je možno vyjádřit jako odhad relativního rizika. Hodnota OR nad 1 naznačuje vyšší riziko vzniku onemocnění u zkoumané skupiny nemocných ve srovnání s kontrolní zdravou skupinou. Byly však také publikovány studie, které nenalezly žádný vztah. Obecně platí, že čím je vyšší výskyt mutovaného genotypu, tím je větší pravděpodobnost, že významně ovlivní chemickou karcinogenezi a sledovaný vztah bude v populaci statisticky významný. Velký důraz je také třeba klást na sestavení sledované skupiny, kde je žádoucí zjistit informace nejen o diagnóze, ale i o stadiu onemocnění, histopatologickém vyšetření a případně i o úspěšnosti léčby, neboť biotransformační enzymy metabolizují také cytostatika a individuální odlišnosti v jejich aktivitě by mohly být zdrojem resistance nádorů k působení cytostatik.

Metodika genotypování

Principem stanovení, které je ke genotypování používáno, je většinou PCR-RFLP neboli řetězová polymerázová reakce s následnou restriční analýzou. V prvním kroku jsou izolovány lymfocyty ze žilní krve, posléze je extrahována genomová DNA a podrobena amplifikací pomocí PCR (obrázek 1). Při PCR dochází k namnožení úseku DNA, v němž se mutace podle literatury nachází. Na hotový produkt se působí restriční endonukleázou, která rozpozná mutovanou DNA od nemutované. Jakákoliv změna v cílové sekvenci restriktázy totiž způsobí, že restriční místo pro jednu endonukleázu zanikne, pro jinou naopak případně vznikne. Pokud podrobíme produkty PCR po inkubaci s endonukleázou agaróze elektroforéze, získáme výsledek, podle něhož je možno jedince hodnotit jako divoké homozygoty, mutované homozygoty nebo heterozygoty neboli jedince s oběma variantami (alelami) genu. Pro genotypová-

Tabulka 3. Přehled metod pro genotypování biotransformačních enzymů

gen	primery pro PCR	délka PCR produktu (bp)	restrikční enzym pro RFLP	délka restrikčních fragmentů (bp)	reference
CYP1A1 (3'-konec)	F: 5'-TAGGAGTCTGTCTCATGCCT-3' R: 5'-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3'	340	MspI	wt: 340 mt: 270, 133	10
CYP2E1 (intron 6)	F: 5'-TCGTCAGTTCCTGAAAGCAGG-3' R: 5'-GAGCTCTGATGGAAGTATCGCA-3'	996	DraI	wt: 572, 303, 121 mt: 875, 121	11
CYP2E1 (5'-konec)	F: 5'-CTACTTGTTCAGTTCTCACCC-3' R: 5'-CTGTGAAGGTAGTCCATAGG-3'	471	RsaI (PstI)	wt: 341, 130 (368, 163) mt: 471	11
EPHX1 (exon 3)	F: 5'-GATCGATAAGTTCGGTTTACC-3' R: 5'-AATCTTAGTCTTGAAGTGAGGAT-3'	163	EcoRV	wt: 140, 20 mt: 163	5
EPHX1 (exon 4)	F: 5'-ACATCCACTTCATCCACGT-3' R: 5'-ATGCCTCTGAGAAGCCAT-3'	210	RsaI	wt: 210 mt: 164, 46	5
GSTM1 (delece)	F: 5'-CTGCCCTACTTGATTGATG-3' R: 5'-CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3'	275	BsmAI	wt: 195, 80 null: žádný produkt	3
GSTP1 (exon 5)	F: 5'-TCCTTCCACGCACATCCTCT-3' R: 5'-AGCCCTTTCTTTGTTTCAGC-3'	294		wt: 294 mt: 234, 60	
GSTT1 (delece)	F: 5'-TTCCTTACTGGTCTCATCTC-3' R: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	480		wt: 480 null: žádný produkt	
GSTM2	F: 5'-CTGCCCTACTTGATTGATG-3' R: 5'-GACTCACTCTGAGCATAGCAC-3'	175		wt: 175 (interní standard)	

Pozn.: F = forward primer, R = reverse primer, bp = párů bazí, wt = divoká alela, mt = mutovaná alela

ní tří enzymů glutathion S-transferáz je vhodné použít elegantní metodu mnohočetné (multiplex) PCR, která umožňuje stanovení všech tří genotypů v jedné zkumavce (3). Přehled všech použitých metod je uveden v tabulce 3.

Výsledky genotypování

1. Stanovení genotypů biotransformačních enzymů u zdravé populace a srovnání s jinými populacemi

Skupina zdravých nepřibuzných subjektů z české populace (n = 416) byla sestavena tak, aby byla vyvážená z hlediska zastoupení obou pohlaví i věkových skupin. Dobrovolníci pocházejí převážně z řad zaměstnanců SZÚ, studentů vysokých škol, sester z nemocnic a lidí z léčeben dlouhodobě nemocných bez známého výskytu nádorových onemocnění. U tohoto souboru

Tabulka 4. Výsledek genotypování CYP1A1 a CYP2E1 v české populaci

Uvedeny jsou počty jedinců s daným genotypem a frekvence mutovaných alel (q^{CYP1A1*2A}, q^{CYP2E1*5B}, q^{CYP2E1*6}), n = počet testovaných jedinců.

CYP1A1-(3'-přiléhající oblast)			CYP2E1-(5'-přiléhající oblast)		
CYP1A1*1A/*1A	CYP1A1*1A/*2A	CYP1A1*2A/*2A	*1A/*1A	*1A/*5B	*5B/*5B
335	72	4	382	18	0
q^{CYP1A1*2A} = 0.097			q^{CYP2E1*5B} = 0.023		
n = 411			n = 400		
Srovnání s jinými populacemi					
q ^{CYP1A1*2A}		q ^{CYP2E1*5B}			
polská	0.066	britská	0.067		
švédská	0.08	finská	0.12		
norská	0.11	francouzská	0.087		
německá	0.057† - 0.077	americká-běloši	0.092 - 0.115		
americká-černoši	0.22	asijská	0.30 - 0.33		
† P = 0.009					
Srovnání s jinými populacemi					
q ^{CYP2E1*6}		q ^{CYP2E1*5B}			
švédská	0.10	0.05*			
finská	0.107	0.012			
britská	-	0.015			
německá	0.082**	0.028 - 0.057			
španělská	-	0.025			
francouzská	0.103	0.034			
americká-běloši	0.09	0.04 - 0.06			
americká-černoši	0.05	0.01 - 0.07			
asijská	0.21 - 0.26	0.17 - 0.26			
* P = 0.036					
** P = 0.022					

byla zjištěna frekvence mutované alely *CYP1A1*2A* 9.7% (tabulka 4). Rozdělení genotypů i frekvence mutované alely bylo srovnáno pomocí kontingenčních tabulek s údaji známými z literatury. U německé populace byl popsán statisticky významný rozdíl v distribuci genotypů. Němečtí autoři totiž našli neobvykle nízký podíl nositelů genotypu *CYP1A1*1A*2A* čili heterozygotů. Tento rozdíl může být dán metodikou, neboť použili jinou metodu stanovení genotypu *CYP1A1* (4). Ostatní bělošské populace měly srovnatelné frekvence

i rozdělení genotypů jako populace česká. Velký rozdíl pak byl popsán při srovnání bělošské populace s populací asijskou i černošskou.

Naše stanovení obou často studovaných genotypů *CYP2E1* přineslo velmi podobné frekvence jako u ostatních bělošských populací Evropy – pro alelu *6 - 7.7% a pro alelu *5B - 2.3% (tabulka 4). U německé a švédské populace sice byly nalezeny statisticky významné rozdíly, ale ty jsou pravděpodobně způsobeny studiem podstatně menšího souboru, protože při tak nízké frekvenci poskytuje mutované alely může snadno dojít k velké statistické chybě. Navíc oba autoři použili pro stanovení genotypů jiné metody. Výrazně vyšší výskyt byl opět nalezen u orientální populace.

Studiem genotypů *EPHX1* byly nalezeny frekvence alely nesoucí *His* v exonu 3 - 38.1% a alely nesoucí *Arg* v exonu 4 - 19.8% (tabulka 5). Rozdělení obou genotypů se významně lišilo od výsledků publikovaných pro anglickou populaci (5). Autoři použili stejnou metodu stanovení a navíc jejich soubor byl co do velikosti srovnatelný. Proto lze uvažovat o možném rozdílu v zastoupení obou genotypů mezi oběma populacemi. Z literatury je známo, že mutovaná alela v exonu 3 má o 50% nižší aktivitu a mutovaná alela v exonu 4 naopak o 25% vyšší aktivitu než nativní protein. Proto je možné se pokusit o odhad aktivity *EPHX1* kombinací sledovaných genotypů. V české populaci by tak bylo cca 13% nositelů vysoké aktivity a 43% nositelů nízké aktivity *EPHX1*. Zatím však bohužel není k dispozici metoda na fenotypování aktivity *EPHX in vivo* a proto není možné tento odhad ověřit.

Tabulka 5. Výsledek genotypování EPHX1 v české populaci

Uvedeny jsou počty jedinců s daným genotypem a frekvence mutovaných alel (q^{EPHX1*2}, q^{EPHX1*3}), n = počet testovaných jedinců.

EPHX1-(exon 3)			EPHX1-(exon 4)		
*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*1	*1/*3	*3/*3
165	163	70	265	118	21
q^{EPHX1*2} = 0.381			q^{EPHX1*3} = 0.198		
n = 398			n = 404		
EPHX1-aktivita, n = 381					
vysoká		střední		nízká	
50		169		162	
13%		44%		43%	
Srovnání s jinými populacemi					
q ^{EPHX1*2}		q ^{EPHX1*3}			
0.31†		0.15††			
německá	0.332	0.21			
americká-běloši	0.36	0.23			
americká-černoši	0.17 - 0.20	0.30			
asijská	0.575	0.117			
† P < 0.001, †† P = 0.047					

Tabulka 6. Výsledek genotypování GST v české populaci

Uvedeny jsou počty jedinců s daným genotypem a frekvence mutovaných alel (qGSTP1*2, qnull), n = počet testovaných jedinců.

GSTP1*1/*1	GSTP1-(exon 5) GSTP1*1/*2	GSTP1*2/*2
203	162	41
qGSTP1*2 = 0.3 n = 406		
Srovnání s jinými populacemi		
švédská	0.328	0.288
britská	0.27	0.29
španělská	0.325	0.31
americká-bělošská	0.35	0.446
asijská	0.14 - 0.19	
GSTM1-(delece)		
plus	plus	minus
199	208	342
qnull = 0.511 n = 407		
GSTT1-(delece)		
plus	plus	minus
199	208	342
qnull = 0.164 n = 409		
Srovnání s jinými populacemi		
qGSTM1-null(GSTM1*2)	qGSTT1-null(GSTT1*2)	
slovenská	0.496	0.17
švédská	0.53	0.11
britská	0.52 - 0.57	0.14 - 0.29 †
německá	0.5 - 0.54	0.13 - 0.18
ruská	0.589 †	-
francouzská	0.46 - 0.56	0.10 - 0.19
americká-bělošská	0.44 - 0.5	0.14 - 0.152
americká-černošská	0.22 - 0.35	0.20 - 0.26
asijská	0.43 - 0.6	0.44 - 0.64
† P = 0.04, †† P < 0.001		

Genotypováním GSTP1 byla zjištěna frekvence mutované alely nesoucí Val - 30% (tabulka 6). Tato frekvence ani rozdělení genotypů se nelišilo od celé řady bělošských populací Evropy.

Frekvence genotypů nesoucích delece v genech GSTM1 a GSTT1 byly v české populaci 51.1% a 16.4%, což jsou velice podobné výsledky jako dříve publikovaná data u české i slovenské populace (tabulka 6). Odchylna u GSTM1, zaznamenaná ve srovnání s ruskou populací je velmi pravděpodobně způsobena tím, že ruští autoři studovali poměrně malý soubor 68 lidí (6). Navíc byl nalezen nesoulad ve frekvenci delece u GSTT1 u jedné práce popisující studium anglické populace, avšak výsledky druhé práce tuto odchylku nepotvrdily a tudíž byla pravděpodobně způsobena metodikou (7,8).

2. Stanovení genotypů biotransformačních enzymů u skupiny pacientů trpících lymfomy ve srovnání se zdravou populací
Příkladem aplikace genotypování je studium skupiny pacientů trpících nádorovým onemocněním lymfatických tkání (n = 219) ve srovnání se zdravou kontrolní skupinou (n = 455), která byla vybrána tak, aby věkové i pohlavní složení odpovídalo skupině pacientů. Statistická analýza výsledků provedená pomocí kontingenčních tabulek ukázala, že mezi pacienty a kontrolami jsou významné rozdíly v rozdělení genotypů CYP2E1-intron 6, kde převažují nosiči mutovaného genotypu *6/*6 u pacientů s ne Hodgkinskými lymfomy (NHL), především s diagnózou velkobuněčných difúzních lymfomů (DLCL) (tabulka 7). Dále byly nalezeny významné rozdíly v rozdělení genotypů EPHX1. Podle těchto výsledků se zdá, že u pacientů s NHL mužského pohlaví převládají nositelé vyšší aktivity EPHX1. Hodgkinova choroba je na druhou stranu charakterizována převahou jedinců s mutovaným genotypem GSTP1 (tabulka 7).

U pacientů byly rovněž sledovány základní klinické a histopatologické charakteristiky jejich onemocnění jako je klinické stadium (KSI-IV dle Ann Arbor klasifikace), stupeň malignity (nízkomaligní vs. agresivní a vysoce agresivní), velikost tumoru, zasažení uzlin, výsledky chemoterapie apod. Analýzou těchto dat byly zjištěny významné odlišnosti u pacientů s různým stupněm malignity. Ždá se, že by zde mohl hrát zajímavou úlohu opět genotyp CYP2E1-intron 6 (tabulka 7).

Tabulka 7. Významné rozdíly v rozložení genotypů mezi kontrolami a pacienty.

Uvedeny počty jednotlivců s daným genotypem, NHL = ne Hodgkinský lymfom, DLCL-difúzní velkobuněčný lymfom, MH = Hodgkinský lymfom, DF = počet stupňů volnosti.

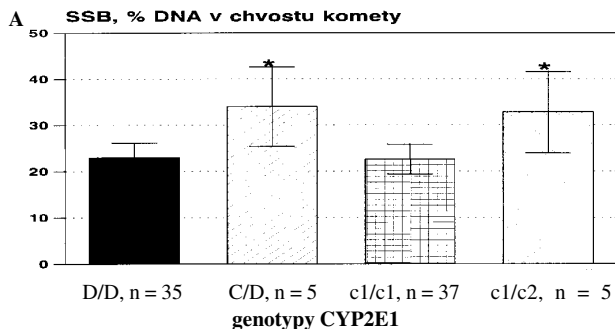
A. CYP2E1 - intron 6					
	všechny lymfomy	kontroly	χ^2	P	
CYP2E1*1A/*1A	192	328	7.0 (DF 2)	0.03	
CYP2E1*1A/*6	22	61			
CYP2E1*6/*6	2	0			
B. EPHX1 - exon 3					
	všechny NHL	kontroly	χ^2	P	
CYP2E1*1A/*1A	123	328	7.48 (DF 2)	0.024	
CYP2E1*1A/*6	15	61			
CYP2E1*6/*6	2	0			
C. GSTP1 - exon 5					
	NHL-DLCL	kontroly	χ^2	P	
CYP2E1*1A/*1A	32	328	10.0 (DF 2)	0.007	
CYP2E1*1A/*6	8	61			
CYP2E1*6/*6	1	0			
D. CYP2E1 - intron 6 vs stupeň NHL					
	všechny MH	kontroly	χ^2	P	
GSTP1*1/*1	38	224	6.18 (DF 2)	0.045	
GSTP1*1/*2	24	184			
GSTP1*2/*2	15	47			
	MH-ženy	kontroly-ženy	χ^2	P	
GSTP1*1/*1	22	115	6.73 (DF 2)	0.035	
GSTP1*1/*2	14	107			
GSTP1*2/*2	9	20			
E. EPHX1 - exon 3 vs extranodální průběh NHL					
	*1A/*1A	*1A/*6	*6/*6	χ^2	P
nízký	26	8	0	10.0 (DF 4)	0.041
střední	51	2	1		
vyšší	6	0	0		
F. GSTP1 - exon 5 vs velikost tumoru NHL					
	EPHX1*1/*1	EPHX1*1/*2	EPHX1*2/*2	χ^2	P
pozitivní	9	11	8	7.5 (DF 2)	0.024
negativní	42	19	8		
G. GSTP1 - exon 5 vs velikost tumoru NHL					
	GSTP1*1/*1	GSTP1*1/*2	GSTP1*2/*2	χ^2	P
do 5.0 cm	13	24	8	7.04 (DF 2)	0.03
nad 5.0 cm	22	11	6		

U pacientů s extranodálním průběhem onemocnění byl zaznamenán vyšší počet jednotlivců s nižší aktivitou EPHX1 a u menších nádorů byl nalezen vyšší počet jedinců s mutovaným genotypem GSTP1 (tabulka 7).

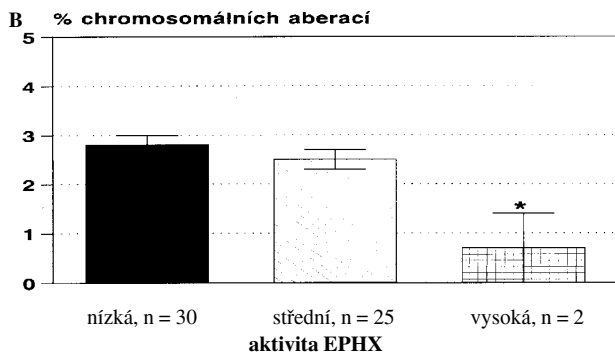
3. Stanovení genotypů biotransformačních enzymů a parametrů genotoxicity u skupiny pracovníků exponovaných styrenu ve srovnání s neexponovanou kontrolní populací
Další sledovanou skupinou populace byli dělníci exponovaní styrenu při ručním laminování. Vzhledem ke známému genotoxickému působení styrenu (9) se tak naskytla vzácná příležitost studovat vliv genetických polymorfismů na metabolickou aktivaci a detoxikaci chemické látky, která je těmito enzymy metabolizována. U obou skupin (exponovaní, n = 44 vs neexponovaní závodní kontroly, n = 19) byly sledovány hlavní biomarkery poškození DNA, tj. jednořetězcové zlomy (SSB), chromosomální aberace (CA) a frekvence mutací v genu HPRT. Hlavním cílem studie bylo nalézt spojení mezi poškozením DNA a enzymy, které metabolicky aktivují styren (CYP1A1 a CYP2E1) a detoxikují metabolity styrenu (EPHX a GST). Za tímto účelem byly stanoveny polymorfismy výše uvedených biotransformačních enzymů (tabulka 1A). Bylo zjištěno, že pracovníci, kteří mají heterozygotní genotyp v intronu 6 nebo na 5'-přiléhajícím konci CYP2E1, mají významně vyšší hladinu SSB (obrázek 2A). Tento enzym metabolizuje styren na reaktivní a mutagenní styren oxid a tudíž

Obrázek 2. Analýza genotypů biotransformačních enzymů a markerů genotoxicity

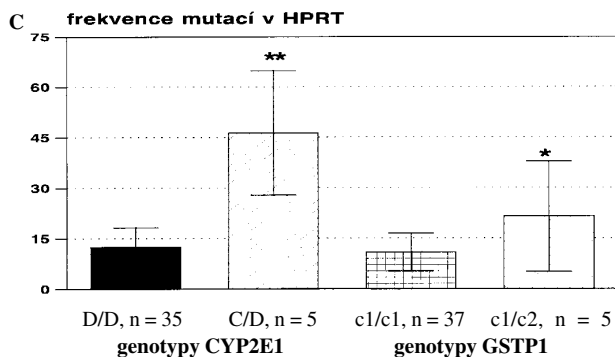
SSB – jednořetězcové zlomy DNA, n= počet analyzovaných osob.



* P = 0,05



* P = 0,044



* P = 0,036, ** P = 0,0008

naše výsledky naznačují, že důsledkem mutace v *CYP2E1* by mohlo být zvýšené riziko vzniku metabolitů styrenu s genotoxickými účinky.

Jednotlivci s nízkou aktivitou EPHX1, předpokázanou na základě výsledků genotypování, měli vyšší frekvenci CA (obrázek 2B) což je v souladu s obecně přijímanou úlohou tohoto enzymu v detoxikaci styren oxidu na méně reaktivní fenylethylen glykol. Vzhledem k malému počtu jedinců s vysokou aktivitou EPHX1 však význam tohoto výsledku zatím nelze přeceňovat.

U heterozygotních jedinců s ohledem na *CYP2E1* a *GSTP1* byla navíc zaznamenána vyšší frekvence mutací v markerovém genu HPRT (obrázek 2C). Negativní úloha těchto polymorfismů v genotoxicitě styrenu však dosud nemohla být statisticky potvrzena, neboť počet mutovaných homozygotů byl ve sledovaném souboru příliš nízký.

Závěr

Tato studie naznačila, že úlohu biotransformačních enzymů v rozvoji lymfomů je třeba dále studovat a přitom je nutno se zaměřit na skupiny pacientů definované užším způsobem, např.: ne Hodgkinové lymfomy skupiny DLCL (difúzní velkobuněčné).

Pilotní studie o úloze polymorfismů biotransformačních enzymů v genotoxických účincích styrenu naznačila, že přestože byla studovaná skupina poměrně malá na to, aby bylo možno vyvodit konkrétní závěry, tento přístup je nadějný a měl by být použit ke studiu enzymů CYP2E1, EPHX1 a GSTP1 u větších skupin exponovaných osob. Tato studie byla cenná také tím, že jsme cíleně sledovali vliv genetického polymorfismu biotransformačních enzymů na vznik genotoxického účinku při expozici definované látce.

Poděkování

Na úplný závěr se patří poděkovat všem pracovníkům, kteří se prezentovaných studií účastnili, a to jak v laboratořích, tak i v „terénu“ při odběrech. Kromě pracovníků odborné skupiny biotransformací SZÚ, kteří se podíleli na genotypování, jsou to také sestry a lékaři z I. interní kliniky fakultní nemocnice na Karlově náměstí, pacienti a ostatní dobrovolníci. Studie o genotoxickém působení styrenu by nevznikla bez příkladné spolupráce několika domácích i zahraničních pracovišť, kterým děkujeme za poskytnuté výsledky hodnocení SSB, CA (Mária Dušínská, Ústav klinické a preventivní medicíny, Bratislava, SR, Mária Zámečnicková, Štátny zdravotný ústav SR, Bratislava, SR) a HPRT (Ad D. Tates, Leiden University Medical Centre, Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, Leiden, The Netherlands). Projekty byly finančně podpořeny granty: GAČR 313/99/1460 a IGA 6747-3.

Literatura

1. Vineis P., Malats N., Lang M. a spol., eds. Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. IARC Sci. Publ. No. 148, Lyon, France, 1999.
2. Guengerich F. P. Human cytochrome P450 enzymes. In: Cytochrome P450 (Ortiz de Montellano PR, ed). Plenum Press, New York, 1995, p. 473-535.
3. Nedelcheva-Kristensen V., Andersen T. I., Erikstein B. a spol. Pharmacogenetics 1998, 8: 441-7.
4. Matthias C., Bockmühl U., Jahnke V. a spol. Pharmacogenetics 1998, 8: 91-100.

5. Smith C. A. D., Harrison D. J. Lancet 1997, 350: 630-3.
6. Baranov V. S., Ivaschenko T., Bakay B. a spol. Hum Genet 1996, 97: 516-20.
7. Stroombergen M. C. M. J., Waring R. H. Hum Exp Toxicol 1999, 18: 141-5.
8. De Sousa M., Pirmohamed M., Kitteringham N. R. a spol. Pharmacogenetics 1998, 8: 353-5.
9. Hemminki K., Vodicka P. Toxicol. Lett. 1995, 77: 153-61.
10. Kawajiri K., Nakachi K., Imai K. a spol. FEBS 1990, 263: 131-3.
11. Šarmanová J., Týnková L., Šusová S., Gut I. and Souček P. Pharmacogenetics, 2000, 10: 781-788.