

ÚLOHA EXPRESE GENŮ CHINONOXIDOREDUKTÁZY 1 A 2 V ROZVOJI KARCINOMU PRSU

ROLE OF GENE EXPRESSION OF QUINONE OXIDOREDUCTASE 1 AND 2 IN PROGRESSION OF BREAST CANCER

HUBÁČKOVÁ M.^{1,2}, VÁCLAVÍKOVÁ R.¹, KUBALA E.³, KODET R.⁴, MRHALOVÁ M.⁴, NOVOTNÝ J.⁵,
VRÁNA D.⁶, GUT I.¹ A SOUČEK P.¹

¹ STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, PRAHA

² 3.LF UK, PRAHA

³ RADIOTERAPEUTICKO-ONKOLOGICKÉ ODDĚLENÍ, FN MOTOL, PRAHA

⁴ ÚSTAV PATOLOGIE A MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNY 2.LF UK A FN MOTOL, PRAHA

⁵ ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFN A 1.LF UK, PRAHA

⁶ KRAJSKÁ NEMOCNICE T.BATI A.S., ZLÍN A 1.LF UK, PRAHA

Souhrn

Východisko: Karcinom prsu je velmi závažné onemocnění, při kterém je včasná diagnóza nemoci kritickým předpokladem úspěšné léčby. V současné době vrcholí snaha hledat spolehlivé prognostické faktory, které by umožnily co nejlépe odhadnout vývoj nemoci. Vhodnými prognostickými markery se jeví také skupina biotransformačních enzymů chinonoxidoreduktáz (NQO1 a NQO2), u kterých již bylo prokázáno spojení s rizikem vzniku karcinomu prsu. **Metody a výsledky:** Pomocí metody real-time PCR byla detekována exprese NQO1 a NQO2 ve všech sledovaných vzorcích pacientek s karcinomem prsu (42 párových vzorků nádorové tkáně, okolní tkáně bez histologicky prokázané infiltrace nádorovými buňkami a 19 vzorků lymfocytů periferní krve). Expres u obou genů vykazovala velkou individuální variabilitu a byla rovněž charakterizována deregulací v nádorové tkáni. Statisticky byly zhodnoceny vztahy mezi expresí obou genů a klinickými a histopatologickými charakteristikami onemocnění. Významně vyšší exprese NQO1 byla nalezena v nenádorové tkáni pacientek po menopauze ($P = 0,036$), u pacientek s pN0 (tj. bez metastatického postižení axilárních lymfatických uzlin, $P = 0,044$) a u pacientek s prokázanou expresí receptorů pro estrogen ($P = 0,020$) a progesteron ($P = 0,040$). Celkově vysoká exprese NQO1 v nenádorové tkáni korelovala s příznivými prognostickými faktory. Tento trend bude ještě třeba ověřit analýzou přežívání v delším časovém horizontu. Pacientky s invazivním ductálním karcinomem mléčné žlázy měly významně nižší expresi NQO2 v nádorové tkáni ve srovnání s lobulárním typem nádoru mléčné žlázy ($P = 0,011$). **Závěr:** Expres NQO1 i NQO2 koreluje s významnými prognostickými faktory u nemocných s karcinomy prsu a jejich studiu je třeba se dále věnovat na větším souboru.

Klíčová slova: karcinom prsu, NQO1, NQO2, exprese, real-time PCR.

Summary

Background: Breast cancer is a highly serious disease in which early diagnosis presents a critical step to successful therapy. At present time, identification of reliable prognostic markers that enable more precise estimation of disease progression is a major scientific target. The group of biotransformation enzymes quinone oxidoreductases (NQO1 and NQO2) seems to be among such targets, as their association with breast cancer risk has been already published. **Methods and Results:** Expression of NQO1 and NQO2 was detected by real-time PCR in 42 paired tumor and surrounding (without morphologically verified presence of tumor cells) tissue samples and in 19 samples of lymphocytes of breast cancer patients. Large inter-individual variability in expression of both genes was found along with deregulation in tumor tissue. Statistical comparisons of expression levels of both genes with clinical and histopathology findings were performed. Postmenopausal patients had significantly higher NQO1 expression in their non-tumor samples when compared to premenopausal ones ($P = 0,036$). Higher NQO1 expression in non-tumor samples was found in patients without axillary lymph node metastasis ($P = 0,044$) and in patients with immunohistochemically detected expression of the estrogen receptor ($P = 0,020$) and progesterone receptor ($P = 0,040$). Generally, high NQO1 expression in non-tumor tissue correlated with factors of good prognosis. This trend should be further verified by survival analysis from a long-term perspective. Lower NQO2 expression was observed in tumor tissues of patients with invasive duct carcinomas of the mammary gland ($P = 0,011$). **Conclusion:** Expressions of NQO1 and NQO2 correlate with well-established prognostic factors in breast carcinoma patients and should be studied further on larger number of patients.

Key words: Breast cancer, quinone reductase 1, quinone reductase 2, gene expression, PCR.

Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen a patří mezi tzv. hormonálně regulované nádory, ovlivněné expresí zejména estrogenů (1). Estrogeny i xenoestrogeny přítomné v zevním prostředí navíc indukují zvýšenou expresi některých růstových faktorů jež ovlivňují proliferativní aktivitu buněk (1). Tyto procesy se uplatňují u většiny tzv. sporadických forem karcinomu prsu, tj. u 75 – 85 % nemocných. U 10 – 15 % vzniká karcinom prsu na základě dědičných genetických změn (tzv. hereditární formy karcinomu prsu), které jsou podmíněny především mutacemi genů BRCA1 nebo BRCA2. Kromě těchto majoritních predispozičních genů (angl. high penetrance) je nyní studována úloha i tzv. genů s nízkou penetrancí (angl. low penetrance), mezi které patří i biotransformační geny.

Chinonoxidoreduktázy jsou flavoproteiny účastníci se druhé fáze biotransformace. V lidském genomu se vyskytují dva geny kódující enzymy NAD(P)H:chinonoxidoreduktázu 1 (NQO1, chromosom 16q22.1, číslo OMIM 125860) a NRH:chinonoxidoreduktázu 2 (NQO2, chromosom 6p25, číslo OMIM 160998). Tyto enzymy katalyzují dvouelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin na relativně stabilní hydrochinony. Ty mohou být dále konjugovány a vylučovány. Navíc látky s chinoidními strukturami patří mezi nejpoužívanější cytostatika (antracykliny).

NQO1 je cytosolický enzym využívající jako donor elektronů kofaktory NADH nebo NAD(P)H. NQO1 se vyskytuje jako homodimer, v každém aktivním centru má jednu prosthetickou skupinu FAD (flavin adenin dinukleotid) (2). NQO1 hraje důležitou roli v ochraně buněk proti toxicitě chinonů tím, že snižuje jejich mutagenitu a karcinogenitu. Vysoká hladina NQO1 byla popsána u řady nádorů a byly nalezeny i rozdíly v hladinách exprese mezi nádorovou i nenádorovou tkání (3). V naší předchozí studii jsme zjistili, že polymorfismus NQO1, způsobující téměř absolutní redukcí enzymové aktivity, je rizikovým faktorem vzniku karcinomu prsu (4). Tyto výsledky jsme potvrdili nezávislou studií rakouské populace nemocných s karcinomy mléčné žlázy (5).

Enzym NQO2 se podobně jako NQO1 vyskytuje v cytosolu a jako kofaktor využívá ribosid dihydronikotinamid (NRH) spíše než NAD(P)H. NQO2 katalyzuje nejen dvouelektronovou redukci chinonů, ale také čtyřelektronovou redukci, při které jako elektronový akceptor *in vitro* využívá methyl červeně (methyl red). U NQO2 bylo nalezeno specifické místo pro vazbu kovů (angl. metal binding site), které u NQO1 není přítomno (6). Enzym NQO2, stejně jako NQO1, chrání buňky proti některým chemickým karcinogenům (7). NQO2 metabolicky aktivuje protinádorové léky, např. CB1954, čímž zvyšuje jejich cytotoxicitu a stimuluje buněčnou smrt (8). V nedávné době bylo také prokázáno, že exprese lidského NQO2 je indukována antioxidanty (9).

Tato pilotní studie se zaměřila především na kvantitativní stanovení exprese NQO1 a NQO2 v souboru pacientek s karcinomem prsu. Poprvé bylo provedeno, metodou absolutní kvantifikace, zřetelný rozdíl v expresi jednotlivých genů mezi prsní nádorovou a nenádorovou tkání. Jako možný marker hladin expresí NQO1 a NQO2 jsme sledovali expresi těchto genů u lymfocytů periferní krve. Hlavním cílem bylo prozkoumání významu exprese NQO1 a NQO2 pro prognózu vývoje onemocnění u pacientek s karcino-

mem prsu, jež bylo provedeno korelací hladin expresí s klinickými nálezy a histopatologickými charakteristikami karcinomů.

Pacientky a metody

Do studie bylo zahrnuto 42 nemocných s histologicky potvrzenou diagnózou karcinomu prsu z období let 1998 – 2005. Sledované klinické a histopatologické charakteristiky pacientek jsou uvedeny v **tabulce č. 1**. Všechny pacientky podepsaly formulář informovaného souhlasu ve shodě s Helsinskou deklarací a studie byla schválena etickou komisí Státního zdravotního ústavu v Praze. U 19 sledovaných nemocných byla v průběhu operace odebrána periferní krev a ihned použita k separaci lymfocytů a izolaci RNA s využitím TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Tabulka 1: Klinické a histopatologické charakteristiky sledovaných pacientek.

Charakteristika	N §
Průměrný věk v době diagnózy (66,6 ± 12,4)	42 (100)
Menopauzální stav	
premenopauzální	6 (14,3)
postmenopauzální	36 (85,7)
Histologický typ nádoru	
invasivní duktální karcinom	32 (76,2)
invasivní lobulární karcinom	7 (16,7)
jiný typ †	2 (4,8)
neurčeno	1 (2,3)
Průměrná velikost nádoru (23,8 ± 10,3 mm)	
≤ 20 mm	21 (50,0)
21 – 49 mm	19 (45,2)
≥ 50 mm	2 (4,8)
Histologický grade	
1	7 (16,7)
2	19 (45,2)
3	9 (21,4)
neurčeno	7 (16,7)
Klinické stadium	
I	12 (28,6)
II	20 (47,6)
III	5 (11,9)
IV	1 (2,4)
neurčeno	4 (9,5)
Receptor pro estrogen	
pozitivní	27 (64,3)
negativní	15 (35,7)
Receptor pro progesteron	
pozitivní	19 (45,2)
negativní	23 (54,8)
Postižení uzlin*	
pozitivní	15 (35,7)
negativní	23 (54,8)
neurčeno	4 (9,5)

§ N = počet pacientek (procentuelní zastoupení je uvedené v závorce)

† mucinozní a malobuněčný karcinom

* kritérium „pozitivita“ – alespoň jedna uzlina s metastatickým postižením

V průběhu operačního výkonu byl nemocným odebrán vzorek tkáně z makroskopicky suspektního ložiska nádoru (pro účely peroperační biopsie) a k nádoru přiléhající okolní tkáň. Vzorky tkání byly histologicky zpracovány a vyšetřeny podle standardních diagnostických procedur. Expres receptořů pro estrogen a pro progesteron byla stanovena imunohistochemicky na histologickém řezu z formolem fixované a do parafinu zalité tkáň. Tkáň s histologicky prokázaným karcinomem byly zařazeny jako reprezenta-

Tabulka 2: Porovnání exprese *NQO1* a *NQO2* v nádoru, nenádorové tkáni a lymfocytech periferní krve pacientek s karcinomem prsu. (A) Hladina exprese pro *NQO1* a (B) hladina exprese pro *NQO2*.

A)							
Expresie <i>NQO1</i> (vyjádřena jako poměr počtu kopií na μg RNA <i>NQO1/PP1A</i>)							
Typ vzorku	N §	Minimum	Maximum	Průměr	S.E.	Medián	Variabilita
nádor	42	0,0248	3,0821	0,5266	0,0961	0,2804	122-krát
nenádorová tkáň*	42	0,0143	3,7983	0,7815	0,1474	0,3618	265-krát
lymfocyty	19	0,0015	0,2335	0,0409	0,0153	0,0112	156-krát
B)							
Expresie <i>NQO2</i> (vyjádřena jako poměr počtu kopií na μg RNA <i>NQO2/PP1A</i>)							
Typ vzorku	N §	Minimum	Maximum	Průměr	S.E.	Medián	Variabilita
nádor	42	0,0023	1,8085	0,1681	0,0530	0,0735	786-krát
nenádorová tkáň*	42	0,0059	1,1459	0,2097	0,0433	0,0910	194-krát
lymfocyty	19	0,0112	0,2278	0,0838	0,0148	0,0731	20-krát

§ počet sledovaných vzorků

* tkáň z okolí nádoru bez morfologicky prokázanych známek přítomnosti nádorových buněk

ktivní pro izolace nukleových kyselin. Ve vzorcích okolní nenádorové tkáni použitých pro izolace nukleových kyselin nebyla morfologicky prokázána přítomnost nádorových buněk. 5 μm tenké kryostatové řezy nádorových a nenádorových tkání byly uchovávány v tekutém dusíku a následně použity pro izolaci celkové RNA s využitím TRIzol reagent. Kvalita výsledného preparátu celkové RNA bylo ověřeno agarózovou elektroforézou a koncentrace určena spektrofotometricky pomocí přístroje Cary 300 (Varian, Palo Alto, CA). Pro syntézu cDNA bylo použito 0,5 μg celkové RNA a kit na syntézu cDNA (MBI Fermentas, Vilnius, Litva). Případná kontaminace genomovou DNA byla posouzena PCR amplifikační fragmentu kontrolního genu ubichitinu C za vzniku produktu z cDNA (190 bp) a z genomové DNA (1009 bp) popsanou metodou (10).

Vyšetření exprese metodou real-time PCR bylo provedeno na systému RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia) za použití TaqMan Gene Expression Assays pro sledované geny (Applied Biosystems, Foster City, CA). Současně se vzorky byly v průběhu real-time PCR měřeny i standardy obsahující cílovou sekvenci genů *NQO1* nebo *NQO2* naklonovanou do plasmidu *pDONR201* pomocí GATEWAY Cloning Kit podle instrukcí výrobce (Invitrogen, Carlsbad, CA). Jako kontrolní gen byl využit cyklofilin A (*PP1A*, chromosom 7p13, číslo OMIM 123840), který byl stanoven za stejných podmínek PCR amplifikace jako *NQO* geny.

Vyhodnocení real-time PCR reakcí bylo prováděno softwarem Rotor-Gene 6000 série verze 1.7. Expresie *NQO1* a *NQO2* byla analyzována metodou absolutní kvantifikace s využitím externí křivky příslušných standardů plasmidů o koncentracích: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 a 10^6 kopií/vzorek. Počet kopií *NQO1* a *NQO2* v každém vzorku byl vztažen na μg celkové RNA. Podobně byl vyhodnocen i počet kopií kontrolního genu *PP1A*. Nakonec byla provedena normalizace počtu kopií *NQO1* nebo *NQO2* na počet kopií *PP1A*. Hladiny exprese *NQO1* a *NQO2* byly korelovány s klinickým průběhem onemocnění a s histopatologickými nálezy pomocí neparametrického Mann-Whitney U testu. Za statisticky významnou byla považována hodnota $P < 0,05$. Sta-

tistická analýza byla provedena programem Statistica 7 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

Výsledky

U všech sledovaných vzorků byla hladina exprese *NQO1* a *NQO2* spolehlivě detekovatelná. V nádorové i nenádorové tkáni byly nalezeny vyšší průměrné hladiny *NQO1* než *NQO2*. Expresie obou genů se vyznačovala velkou individuální variabilitou mezi jednotlivými pacientkami. Při porovnání rozdílů exprese obou sledovaných genů byly nalezeny významně vyšší průměrné exprese v nenádorové tkáni oproti nádorové tkáni (viz. **tabulka č.2**). Při hodnocení hladin ve vzorcích jednotlivých pacientek byly nalezeny vyšší hodnoty exprese *NQO1* a *NQO2* v nenádorové oproti nádorové tkáni u 20 (47,6%) resp. 26 (61,9%) z celkového počtu 42 vzorků. Na druhé straně však u některých pacientek byly nalezeny více než 3x vyšší hladiny exprese *NQO1* (u 12 pacientek ze 42, tj. 28,6%) i *NQO2* (u 6 pacientek ze 42, tj. 14,3%) v nádorové oproti nenádorové tkáni.

Klinické a patologické charakteristiky souboru pacientek jsou shrnuty v **tabulce č.1**. Věkový průměr sledovaného souboru pacientek s karcinomem prsu byl 67 let a 85,7% pacientek se nacházelo v období po menopauze. Lokálně rozvinuté nádory (klinické stádium I, IIA či IIB) mělo 76,2% pacientek. Z histologického hlediska se jednalo především o invazivní ductální karcinomy prsu (76,2%) s průměrnou velikostí všech typů nádorů $23,8 \pm 10,3$ mm. Expresie receptorů pro estrogen byla nalezena u 64,3 % a exprese receptorů pro progesteron u 45,2% pacientek.

Při hodnocení vztahů hladin *NQO1* a *NQO2* ke sledovaným klinickým a histopatologickým faktorům byla nalezena řada významných korelací, které jsou shrnuty v **tabulce č.3**. Pacientky po menopauze měly významně vyšší hladinu exprese *NQO1* v nádorové tkáni ve srovnání s pacientkami před menopauzou ($P = 0,033$; viz. **tabulka č.3A**). Obdobně tomu bylo v jejich nenádorové tkáni ($P = 0,036$, viz. **tabulka č.3B**). Vyšší exprese *NQO1* v nenádorové tkáni jsme zjistili u nemocných bez metastatického postižení lymfatických uzlin, tj. pN0 (negativní node status, $P = 0,044$) a s pozitivitou jak receptorů pro estrogen ($P = 0,020$) tak

Tabulka 3: Významné vztahy mezi expresí genů *NQO1* a *NQO2* v nádorové a nenádorové tkáni a klinickými a histopatologickými charakteristikami karcinomů vyšetřených nemocných

A. <i>NQO1</i> nádorová tkáň	N §	Průměr ± S.E.	P (2-sided)
Postmenopauzální stav	36	0,59 ± 0,11	
Premenopauzální stav	6	0,16 ± 0,09	0,033
B. <i>NQO1</i> nenádorová tkáň	N	Průměr ± S.E.	P (2-sided)
Postmenopauzální stav	36	0,88 ± 0,17	
Premenopauzální stav	6	0,21 ± 0,01	0,036
Uzliny bez metastáz (N0)	23	1,14 ± 0,24	
Uzliny s metastázami (N1-N3)	15	0,38 ± 0,11	0,044
Pozitivní ER *	27	0,91 ± 0,18	
Negativní ER	15	0,56 ± 0,25	0,020
Pozitivní PR *	19	1,07 ± 0,25	
Negativní PR	23	0,55 ± 0,17	0,040
C. <i>NQO2</i> nádorová tkáň	N	Průměr ± S.E.	P (2-sided)
Invazivní duktální karcinom	32	0,46 ± 0,08	
Invazivní lobulární karcinom	7	0,55 ± 0,22	0,011
D. <i>NQO2</i> nenádorová tkáň	N	Průměr ± S.E.	P (2-sided)
Klinické stádium T1	18	0,15 ± 0,06	
Klinické stádium T2-T4	20	0,30 ± 0,07	0,048

§ počet sledovaných vzorků

* ER – receptor pro estrogen, PR – receptor pro progesteron

pro progesteron ($P = 0,040$). Pacientky s invazivním duktálním karcinomem měly významně nižší expresi *NQO2* v nádorové tkáni než pacientky s lobulárním typem nádoru ($P = 0,011$, viz. **tabulka č.3C**). Expres *NQO2* v nenádorové tkáni byla ve vztahu k velikosti nádoru na hranici významnosti. Pacientky s vyšší expresí *NQO2* měly častěji nádory větší než 20 mm ($P = 0,048$, viz. **tabulka č.3D**). Další významné vztahy hladin exprese studovaných genů ke klinickým a histopatologickým faktorům nebyly nalezeny. Expres *NQO1* ani *NQO2* v lymfocytech nekorelovala s příslušnou expresí těchto genů v nádorové či nenádorové tkáni.

Diskuze

V našich předchozích studiích, které se zaměřily na sledování polymorfismu *NQO1*, se nám podařilo prokázat vztah genotypu *NQO1* k riziku vzniku karcinomu prsu u české populace (4) a v mezinárodní studii jej potvrdit na rakouské populaci (5). Proto jsme se v této pilotní studii snažili tento rizikový potenciál hlouběji prozkoumat a případně nalézt další možné informace o úloze *NQO1* a příbuzného *NQO2* na úrovni genové exprese. Tato pilotní studie za použití metody real-time PCR jednoznačně prokázala expresi genů *NQO1* a *NQO2* v nádorech, v okolní přiléhající nenádorové tkáni i v periferních lymfocytech pacientek s karcinomem prsu. Vysoká expres *NQO1* již byla nalezena v řadě lidských nádorových i nenádorových tkání (karcinom prsu, plic, tračnicku, jater atd.) (11,12,13,14,15). Pomocí Northern blotu byla hladina genové exprese *NQO2* zjištěna v srdci, mozku, plicích, játrech, ledvinách a v kosterních svalech (16). Imunohistochemickými studiemi bylo zjištěno, že *NQO1* v lidských tkání je hlavně lokalizován v endoteliálních a epiteliálních tkání v mnoha různých orgánech včetně

očí (17). Naše studie je unikátní v tom, že nabízí významně přesnější stanovení genové exprese metodou absolutní kvantifikace pomocí real-time PCR jež dosud nebylo publikováno.

V průměru byly nalezeny vyšší exprese genů *NQO1* a *NQO2* v nenádorové oproti nádorové tkáni, tzn. v nádorové tkáni během rozvoje onemocnění došlo ke snížení exprese sledovaných genů (downregulace). U některých pacientek však byly nalezeny více než 3x vyšší hladiny exprese *NQO1* i *NQO2* v nádorové oproti nenádorové tkáni (upregulace). Tento fakt naznačuje možné využití kvantitativního stanovení exprese *NQO1* a *NQO2* v budoucnu při individualizované chemoterapii cytostatiky založenými na aktivaci enzymy kódovanými *NQO1* nebo *NQO2*. V odborné literatuře již na toto téma probíhá diskuze (7,18,19).

Ve snaze zjistit zda by bylo možné, pro odhad hladin exprese ve sledované tkáni, použít lymfocyty periferní krve byly u 19 pacientek korelovány hladiny exprese *NQO1* a *NQO2* v lymfocytech s hladinami ve zkoumaných tkáních. Expres *NQO1* ani *NQO2* v periferních lymfocytech však s expresí v nádorové či nenádorové tkáni významně nekorelovala. Pravděpodobně tedy nebude možné použít pro vyšetření exprese *NQO1* a *NQO2* lymfocyty (což by umožňovalo nejen primární stanovení hladin exprese těchto genů, které je vhodnější přímo z nádorové tkáně, ale hlavně by umožnilo průběžné sledování dynamiky exprese v průběhu léčby a po jejím ukončení).

Pro posouzení významu exprese *NQO1* a *NQO2* pro prognózu vývoje karcinomu prsu jsme porovnali výsledky sledování exprese *NQO1* a *NQO2* s klinickými a histopatologickými charakteristikami nádorů jednotlivých nemocných. Studie zabývající se podobnou tematikou nebyly dosud publikovány. Naše studie našla některé velmi zajímavé vztahy. Významně vyšší expres *NQO1* zjištěné v tkáních pacientek s primární diagnózou onemocnění po menopauze naznačuje možné ovlivnění kolísáním hormonálních hladin u premenopauzálních žen. Tento předpoklad vychází z toho, že k regulaci exprese *NQO1* může docházet nejen pomocí Ah receptoru či fenolických antioxidantů a metabolitů polycyklických aromátů, ale i pomocí antiestrogenů a estrogenových receptorů (20). Nález významně nižší exprese *NQO2* v nádorové tkáni pacientek s invazivním duktálním karcinomem oproti pacientkám s invazivním lobulárním karcinomem by bylo vhodné korelovat na úrovni proteinu s imunohistochemicky zjištěnou expresí *NQO1* a *NQO2* proteinů u jednotlivých typů karcinomů. V případě potvrzení vztahu exprese na úrovni mRNA a proteinů a ověření významu tohoto stanovení na větším souboru nemocných by bylo možné gen *NQO2* začlenit do panelu markerů molekulárně-patologického profilu karcinomů prsu. K nejzajímavějším vztahům patří nález významně zvýšené exprese *NQO1* u pacientek s lepší prognózou onemocnění (postmenopauzální stav, pN0, ER+ a PR+). Tento výsledek by mohl mít význam pro zpřesnění zařazení jednotlivých nemocných do léčebných skupin. Pro ověření a lepší využití poznatků je třeba rozšířit studii na větší skupinu pacientek, porovnat vývoj onemocnění u jednotlivých pacientek s odstupem času po léčbě (korelace s přežitím, kompletní remisí, recidivami atd.) a rovněž prozkoumat vztah mezi genovou expresí a hladinami proteinu sledovaného například imunohistochemicky. Další zajímavé infor-

mace ohledně prognostického a prediktivního významu expresí obou genů může přinést analýza přežívání ve vztahu k typu použité chemoterapie, kterou plánujeme v dlouhodobější perspektivě.

Závěr

Pilotní studie sledující expresi genů 2.fáze biotransformace *NQO1* a *NQO2* prokázala na souboru pacientek s karcinomem prsu významné exprese jak v nádorové tak i v nenádorové tkáni a v lymfocytech periferní krve. Na základě dosažených výsledků je možno usuzovat, že vysoká exprese *NQO1* v nenádorové tkáni by mohla charakterizovat pacientky s lepší prognózou vývoje nemoci.

Naproti tomu nízká exprese *NQO2* by mohla naznačovat větší pravděpodobnost vývoje agresivnějšího průběhu onemocnění. Celkově se tedy exprese *NQO1* i *NQO2* jeví jako potenciální prognostický faktor vývoje karcinomu prsu. Pro možné využití výsledků v klinické praxi navrhujeme ověřit získané informace sledováním hladin *NQO1* a *NQO2* i příslušných proteinových produktů u většího souboru pacientek a s časovým odstupem od diagnózy onemocnění.

Poděkování: Projekt byl podpořen grantem IGA 9426-3, Grantem Univerzity Karlovy GAUK č. 94507 a výzkumným programem na podporu mladých vědců SZÚ Praha.

Literatura

- Klener P, Abrahámová J: Nádory prsu. In: Klener, P.: Klinická onkologie, Praha, Galén; 2002. s.495.
- Hosoda S, Nakamura W, Hayashi K: Properties and reaction mechanism of DT-diaphorase from rat liver. *J Biol Chem* 1974;249: 6416-23.
- Ross D: NAD(P)H:quinone oxidoreductases. In: Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine, New York, John Wiley&Sons, Inc.; 2002.
- Šarmanova J, Šušová S, Gut I et al: Breast cancer: Role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *Eur J Hum Genet* 2004;12:848-854.
- Menzel HJ, Sarmanova J, Soucek P et al: Association of *NQO1* polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *Br J Cancer* 2004;90:1989-1994.
- Foster CE, Bianchetti MA, Talalay P et al: Crystal structure of human quinone reductase type 2, a metalloflavoprotein. *Biochemistry* 1999;38:9881-9886.
- Iskander K, Paquet M, Brayton C, Jaiswal AK: Deficiency of NRH:oxidoreductase 2 increases susceptibility to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene-induced skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2004;64:5925-5928.
- Knox RJ, Jenkins TC, Hobbs SM et al: Bioactivation of 5-(anzirin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by human NAD(P)H quinone oxidoreductase 2: a novel co-substrate-mediated antitumor prodrug therapy. *Cancer Res* 2000;60:4179-4186.
- Wang W, Jaiswal AK: Nuclear factor Nrf2 and antioxidant response element regulate NRH:quinone oxidoreductase 2 (*NQO2*) gene expression and antioxidant induction. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1119-1130.
- Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalova I, Dvorak M: Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 2005;23:1417-1422.
- Schlager JJ, Powis G: Cytosolic NAD(P)H:quinone-acceptor oxidoreductase in human normal and tumor tissue: effects of cigarette smoking and alcohol. *Int J Cancer* 1990;45:403-409.
- Malkinson AM, Siegel D, Forrest GL et al: Elevated DT-diaphorase activity and messenger RNA content in human non-small cell lung carcinoma: relationship to the response of lung tumor xenografts to mitomycin C1. *Cancer Res* 1992;52:4752-4757.
- Mekhail-Ishak K, Hudson N, Tsao MS, Batist G: Implications for therapy of drug metabolizing enzymes in human colon cancer. *Cancer Res* 1989;49:4866-4869.
- Smitskamp-Wilms E, Giaccone G, Pinedo HM et al: DT-diaphorase activity in normal and neoplastic human tissues; an indicator for sensitivity to bioreductive agents. *Br J Cancer* 1995;72:917-921.
- Mikami K, Naito M, Ishiguro T et al: Immunological quantitation of DT-diaphorase in carcinoma cell lines and clinical colon cancers: advanced tumors express greater levels of DT-diaphorase. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:910-915.
- Jaiswal AK: Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase2 gene structure, activity, and tissue-specific expression. *J Biol Chem* 1994;269:14502-14508.
- Siegel D, Ross D: Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*) in human tissues. *Free Radic Biol Med* 2000;29:246-253.
- Celli CM, Tran N, Knox R, Jaiswal AK: NRH:quinone oxidoreductase 2 (*NQO2*) catalyzes metabolic activation of quinones and anti-tumor drugs. *Biochem Pharmacol* 2006;72(3):366-376.
- Jamieson D, Wilson K, Pridgeon S et al: NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and NRH:quinone oxidoreductase 2 activity and expression in bladder and ovarian cancer and lower NRH:quinone oxidoreductase 2 activity associated with an *NQO2* exon 3 single-nucleotide polymorphism. *Clin Cancer Res* 2007;13(5):1584-1590.
- Montano MM, Katzenellenbogen B: The quinone reductase gene: A unique estrogen receptor-regulated gene that is activated by anti-estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2581-2586.

Korespondenční adresa:

Ing. Míluše Hubáčková,
Oddělení Biotransformací, CPL, Státní zdravotní ústav,
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10,
Tel: +4202 6708 2681, E-mail:hubackova@szu.cz

Došlo / Submitted: 8. 6. 2007
Přijato / Accepted: 29. 6. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů. The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.