

ÚLOHA GENETICKÝCH POLYMORFISMŮ BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ V ROZVOJI KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

ROLE OF POLYMORPHISMS OF BIOTRANSFORMATION ENZYMES IN COLORECTAL CANCER

ŠŮSOVÁ S.¹, NOVOTNÝ J.², VODIČKA P.³ A SOUČEK P.^{1*}

¹ ODBORNÁ SKUPINA BIOTRANSFORMACÍ, CENTRUM PRACOVNÍHO LÉKAŘSTVÍ, STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV PRAHA

² ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFN A IILF UK PRAHA

³ ODDĚLENÍ GENETICKÉ A MOLEKULÁRNÍ TOXIKOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY, AKADEMIE VĚD ČR PRAHA

SOUHRN: Východiska: S ohledem na prokázanou souvislost mezi prostředím a genetickou dispozicí bylo hlavním úkolem posoudit vztah mezi genetickými polymorfismy biotransformačních enzymů a kolorektálním karcinomem (CRC). Typ studie a soubor: Studie případů a kontrol - 314 pacientů s CRC a 591 kontrolních subjektů české národnosti.

Metody a výsledky: Restrikční analýzou PCR fragmentů byly sledovány frekvence a rozložení polymorfismů v genech: cytochrom P450 1B1, epoxid hydroláza, NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza a glutathion S-transferázy.

Statistická analýza ukázala, že 1/ jednotlivé polymorfismy nemají statisticky významný vliv na riziko vzniku CRC u neselektované populace. 2/ Ve skupině žen byl rizikovým faktorem polymorfismus chinon oxidoreduktázy. Nositelky variantního genotypu měly více než třikrát vyšší riziko vzniku CRC v porovnání se ženami s normálním genotypem ($P = 0,034$). U mužů tento polymorfismus nehrál významnou úlohu, ovšem jeho úloha v rakovině prsu u žen byla nedávno publikována jak u české, tak u rakouské populace. 3/ Z kombinací genů byly nejzajímavějšími kombinace genů glutathion S-transferáz. U všech testovaných kombinací byly dosaženy vztahy na hranici významnosti ($P < 0,1$). 4/ Věk výsledky statistických analýz neovlivnil.

Závěry: První studie tohoto druhu na české populaci ukázala, že polymorfismy některých biotransformačních enzymů se mohou spolupodílet na rozvoji CRC. Další studium je třeba zaměřit především na hledání rozdílů v expozici mezi oběma pohlavími, na studium významu kombinací polymorfismů a širší spektrum genů s nízkou penetrancí.

Klíčová slova: kolorektální karcinom - riziko - metabolismus - polymorfismy

ABSTRACT: Background: Considering the proven significance of interplay between environmental and genetic factors in cancer, we aimed at determining whether any association exists between genetic polymorphisms in biotransformation enzymes and colorectal cancer (CRC).

Design and Subjects: Case-control study comprised of 314 CRC patients and 591 controls of Czech origin.

Methods and Results: Frequencies and distribution of polymorphisms in cytochrome P450 1B1, epoxide hydrolase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase and glutathione S-transferase were followed by restriction analysis of PCR fragments. Statistical analysis showed: 1/ The lack of association of particular polymorphisms with CRC risk in unselected population. 2/ Female carriers of variant genotype in quinone oxidoreductase were at more than three-fold risk of CRC in comparison with those carrying normal genotype ($P = 0.034$). There was no association of this polymorphism with CRC risk in males, but its role in breast cancer was published in Czech and Austrian populations. 3/ The most interesting gene combinations seemed to be those comprising of glutathione S-transferases as associations of borderline significance were found ($P < 0.1$). 4/ Age played no role as confounding factor.

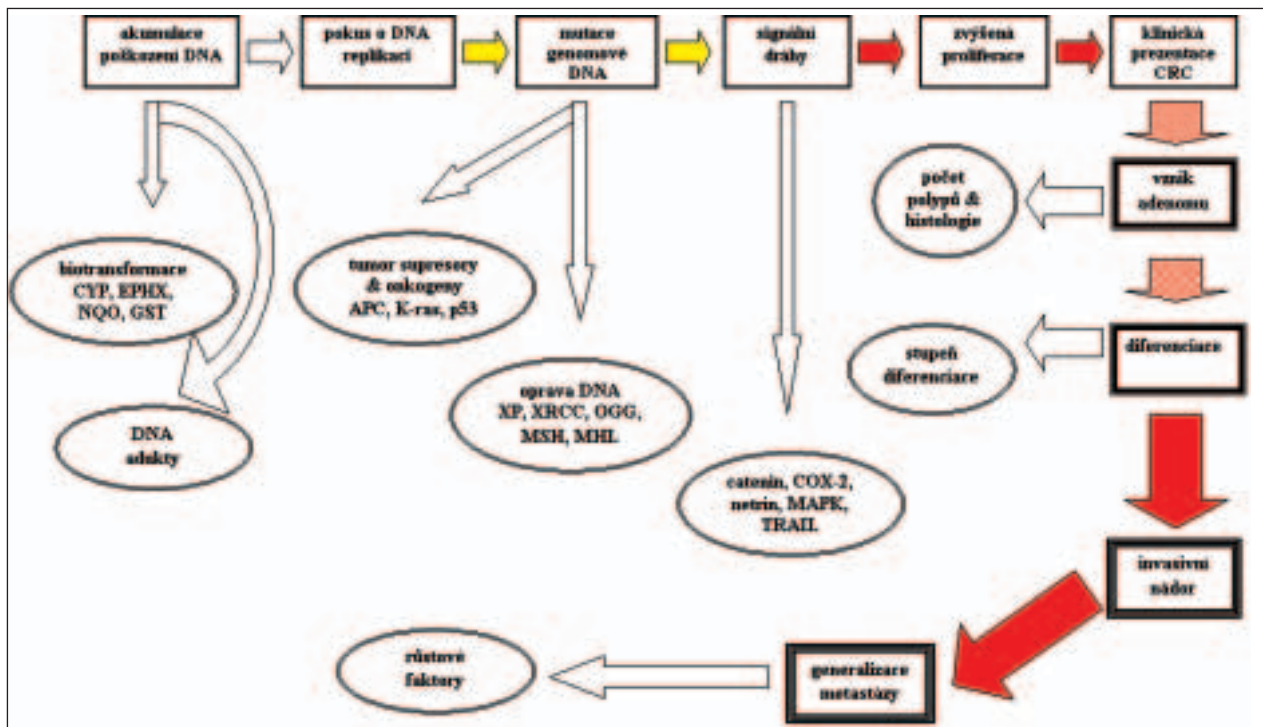
Conclusions: First study of this kind in Czech population showed that polymorphisms in biotransformation enzymes may affect onset of CRC. Further studies should be focused at searching for differences in exposure between genders, assessment of importance of larger selection of low penetrance genes and polymorphism combinations.

Keywords: colorectal - cancer - risk - metabolism - polymorphisms

Úvod

Kolorektální karcinom (colorectal cancer, CRC) je častým onemocněním mužů i žen ve vyspělém světě. Odhady naznačily, že v celosvětovém měřítku tímto nádorem onemocní v průběhu svého života až 5% jedinců (1). CRC svou čet-

ností zaujímá čtvrté místo mezi všemi sledovanými druhy nádorových onemocnění. Každý rok je zjištěno kolem 875 000 nových případů a v poslední dekádě incidence CRC v Evropě stoupá. Na tomto nárůstu se bohužel výrazně podílí populace České republiky, která zaujímá čtvrtou nejvyšší



Obr. č. 1: Jednotlivé kroky vzniku kolorektálního karcinomu - model výběru biomarkerů.

pozici a v případě rakoviny rektu dokonce první (2, 3). Vznik CRC je v poslední době spojován se třemi modely: sporadický (zahrnuje více než 75% případů), rodinný (<20%) a dědičný (5% - především FAP a HNPCC). Na vzniku více než 75% sporadických případů CRC se podílejí faktory životního prostředí a vnímavost určená především polymorfismy a mutacemi v genech s nízkou penetrancí. Mezi celou řadou faktorů vnímavosti, které jsou v poslední době sledovány (obrázek 1) jsme ke studiu zvolili geny metabolismu neboli biotransformace.

Geneticky variabilní biotransformační enzymy: cytochromy P450 (CYP, EC 1.14.14.1) epoxid hydroláza (EPHX, EC 3.3.2.3), NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza (NQO, EC 1.6.99.2) a glutathion S-transferázy (GST, EC 2.5.1.18) metabolizují a konjugují léčiva, karcinogeny a látky přírodního původu (4). Některé látky (prokarcinogeny) jsou těmito enzymy metabolicky aktivovány na mutageny a karcinogeny. Jiné látky jsou převážně detoxikovány. V souhrně s expozicí těmto látkám tak funkčnost biotransformačních enzymů může ovlivnit individuální riziko vzniku nádorového onemocnění (5). *CYP1B1* byl lokalizován do oblasti 2p21-p22 chromozomu 2 (6). Protein metabolizuje 17beta-estradiol na 4-hydroxyestradiol, což je endogenní karcinogen, u kterého se předpokládá vztah k rozvoji rakoviny prsu a dělohy (7). P450 1B1 také aktivuje řadu polycyklických aromatických uhlovodíků a arylaminů (8), takže je zajímavý i z hlediska genotoxicity. V *CYP1B1* byla popsána celá řada polymorfismů z nichž dvě varianty v exonu 3 (pozice - C4326G, záměna aminokyseliny - Leu432Val, název alel - *CYP1B1**1/*3 a A4390G, Asn453Ser, *CYP1B1**1/*4) jsou nejlépe charakterizované (9). Varianta *CYP1B1**3 metabolizuje pomaleji benzo(a)pyren na mutagení metabolit (10) a varianta *CYP1B1**4 podléhá degradaci významně rychleji než produkty exprese normální alely *CYP1B1**1, což se promítá ve více než dvakrát nižší hladině a aktivitě proteinu (11). Ve studii Sachse a spol. (12) nebyla prokázána spojitost mezi variantou *CYP1B1**3 a rizikem CRC. Další studie zabývající se úlohou variant *CYP1B1* však dosud publikovány nebyly.

EPHX1 katalyzuje hydrolýzu epoxidů na méně reaktivní trans-dihydrodioly (13). *EPHX1* je lokalizován na chromozomu 1

(1q42.1). Nejčastěji se vyskytující polymorfismy *EPHX1* jsou v exonu 3 (T337C, Tyr113His, *EPHX1**1/*3) a exonu 4 (A415G, His139Arg, *EPHX1**1/*4). Oba polymorfismy mají vliv na aktivitu vytvářeného proteinu (exon 3 – nízká aktivita, exon 4 – vysoká aktivita; cit. 14). Úloha *EPHX1* v CRC je kontroverzní. V poslední době byly publikovány studie ukazující na možné spojení vysoké aktivity enzymu se zvýšeným rizikem pokročilého adenomu kolorekta (11, 15), ale byly zveřejněny rovněž negativní výsledky (16).

NQO1 se nachází na chromozómu 16 (16q22.1) a kóduje dvouelektronovou reduktázu, která bioaktivuje i detoxikuje látky se strukturálními motivy chinonů. Úloha *NQO1* je často diskutována ve spojení s chemoprevencí (17). Polymorfismus v exonu 6 *NQO1* (C609T, Pro187Ser, *NQO1**1/*2) byl označen jako rizikový faktor CRC (18) a rakoviny prsu (19, 20). Hou a spol. (21) našli kombinaci alel *NQO1**2 a *CYP1A1**2 jako rizikový faktor CRC především u kuřáků.

Enzymy GST se podílí na detoxikaci velké řady karcinogenů. *GSTM1* je lokalizovaný na chromozómu 1 (1p13.3) a *GSTT1* na chromozómu 22 (22q11.2). Delece *GSTM1* (alela null nebo *GSTM1**2/*2) je často studována jako rizikový faktor v rozvoji rakoviny. Další gen z této skupiny, *GSTT1* obsahuje rovněž deleční polymorfismus (null nebo *GSTT1**2/*2; cit. 22). Delece v genech *GSTM1* a *GSTT1* byly spojeny se zvýšeným rizikem CRC na poměrně malém vzorku turecké populace (23). Úloha *GSTT1* byla naznačena i nedávno publikovanou studií Yeh a spol. (24) na populaci asijské.

GSTP1 nacházející se na chromozómu 11 (11q13) je vysoce exprimován v některých buněčných liniích resistentních vůči cytostatikům. Board a spol. (25) našli dva často se vyskytující polymorfismy *GSTP1*, z nichž variantní alela v exonu 5 (A313G, Ile105Val, *GSTP1**1/*2) exprimuje enzym se sníženou tepelnou stabilitou a substrátovou afinitou (26). Polymorfismy v genech *GSTP1*, *XPD*, *ERCC1* a *TS* mohou napomoci při predikci výsledku chemoterapie CRC 5-fluorouracilem a oxaliplatinou (27).

Z výše uvedeného vyplývá složitost problematiky studia genetických polymorfismů a potřeba výsledky ověřovat, zpřesňovat a sledovat především kombinace genů a polymorfismů, které nebyly dosud analyzovány. Rovněž je třeba sledovat tyto

Tabulka č. 1: Rozdělení genotypů *CYP1B1*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, a *NQO1* ve studii případů a kontrol. V tabulce jsou uvedeny počty nositelů jednotlivých genotypů (v závorce procentuální vyjádření).

Gen	genotyp	kontroly	pacienti	OR ¹	95% CI ¹	C ²	P
<i>CYP1B1</i> (kodon 432)	*1/*1	140 (31,6)	111 (35,6)	-	-	-	-
	*1/*3	236 (53,3)	136 (43,6)	0,727	0,524-1,007	3,679	0,055
	*3/*3	67 (15,1)	65 (20,8)	1,224	0,802-1,867	2,483	0,349
	N	443	312			7,767 ²	0,021 ²
<i>CYP1B1</i> (kodon 453)	*1/*1	310 (69,8)	225 (72,1)	-	-	-	-
	*1/*4	126 (28,4)	81 (26,0)	0,886	0,638-1,229	0,527	0,468
	*4/*4	8 (1,8)	6 (1,9)	1,003	0,353-3,020	0,004	0,952
	N	444	312			0,542 ²	0,763 ²
<i>EPHX1</i> (exon 3)	*1/*1	250 (43,9)	148 (47,4)	-	-	-	-
	*1/*3	233 (40,9)	119 (38,1)	0,863	0,639-1,165	0,930	0,335
	*3/*3	86 (15,1)	45 (14,4)	0,884	0,584-1,337	0,342	0,559
	N	569	312			1,009 ²	0,604 ²
<i>EPHX1</i> (exon 4)	*1/*1	341 (61,1)	189 (60,6)	-	-	-	-
	*1/*4	191 (34,2)	107 (34,3)	1,011	0,752-1,359	0,005	0,944
	*4/*4	26 (4,7)	16 (5,1)	1,110	0,581-2,122	0,100	0,751
	N	558	312			0,101 ²	0,951 ²
<i>NQO1</i> (exon 6)	*1/*1	347 (69,8)	216 (69,2)	-	-	-	-
	*1/*2	137 (27,6)	86 (27,6)	1,008	0,733-1,387	0,003	0,959
	*2/*2	13 (2,6)	10 (3,2)	1,236	0,533-2,867	0,244	0,622
	N	497	312			0,244 ²	0,885 ²
<i>GSTM1</i> (deletion)	plus	268 (47,5)	138 (44,2)	-	-	-	-
	null	296 (52,5)	174 (55,8)	1,142	0,865-1,507	0,873	0,350
	N	564	312				
<i>GSTT1</i> (deletion)	plus	449 (83,1)	256 (82,1)	-	-	-	-
	null	91 (16,9)	56 (17,9)	1,079	0,748-1,557	0,167	0,683
	N	540	312				
<i>GSTP1</i> (exon 5)	*1/*1	260 (47,1)	134 (42,9)	-	-	-	-
	*1/*2	227 (41,1)	153 (49,0)	1,308	0,976-1,752	3,242	0,072
	*2/*2	65 (11,8)	25 (8,0)	0,746	0,450-1,238	1,290	0,256
	N	552	312			6,302 ²	0,043 ²

¹ Odhad relativního rizika (odds ratio, OR) a interval spolehlivosti (confidence interval, CI) pro tabulky 2x2 statistikou podle Mantel-Haenszela (jeden stupeň volnosti).

² Rozdělení genotypů testem Pearson Chi-Square 3x2 (dva stupně volnosti).

Tabulka č. 2: Odhad aktivity EPHX1 na základě kombinace obou sledovaných genotypů ve studii případů a kontrol. V tabulce jsou uvedeny počty jedinců s danou aktivitou (v závorce procentuální vyjádření).

Aktivita EPHX1	kontroly	pacienti	χ^2	P
nízká	220 (39,6)	111 (35,6)	-	-
střední	239 (43,0)	146 (46,8)	-	-
vysoká	97 (17,4)	55 (17,6)	-	-
N	556	312	1,493 ¹	0,474 ¹
Aktivita EPHX1	OR ²	95% CI ²	χ^2	P ²
střední vs. nízká	1,211	0,890-1,646	1,489	0,222
střední vs. vysoká	0,928	0,629-1,370	0,141	0,708
vysoká vs. nízká	1,124	0,752-1,680	0,324	0,569

¹ Pearson Chi-Square Test 3x2 (dva stupně volnosti).

² Odhad relativního rizika (odds ratio, OR) a interval spolehlivosti (confidence interval, CI) pro tabulky 2x2 statistikou podle Mantel-Haenszela (jeden stupeň volnosti).

vztahy u populací s vysokou incidencí CRC jako je česká populace. Pro tuto studii byly záměrně vybrány enzymy, jejichž relevance v metabolismu kontaminant životního prostředí je dostatečně prokázána. Jednotlivé polymorfismy byly zvoleny s ohledem na publikovaný vztah k funkci exprimovaného proteinu.

Materiál a metody

Materiál. Restrikční enzymy a deoxynukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) vyrobené firmou New England Biolabs (Beverly, MA, USA) byly zakoupeny od distributora Biotech s r.o. RedTaq polymeráza byla od firmy TopBio s r.o. Ultra-Pure agaróza od Life Technologies (Paisley, UK) a oligonuk-

Tabulka č. 3: Pohlavní rozdíly v rozdělení genotypů *NQO1* ve studii případů a kontrol. V tabulce jsou uvedeny počty nositelů jednotlivých genotypů (v závorce procentuální vyjádření).

Ženy							
Gen	genotyp	kontroly	pacienti	OR ¹	95% CI ¹	c ²	P
<i>NQO1</i> (exon 6)	*1/*1	225 (71,7)	83 (70,5)	-	-	-	-
	*1/*2	83 (26,4)	33 (26,8)	1,078	0,670-1,734	0,095	0,757
	*2/*2	6 (1,9)	7 (5,7)	3,163	1,033-9,684	4,473	0,034
	N	314	123			4,469 ²	0,107 ²
Muži							
Gen	genotyp	kontroly	pacienti	OR ¹	95% CI ¹	c ²	P
<i>NQO1</i> (exon 6)	*1/*1	122 (66,7)	132 (70,2)	-	-	-	-
	*1/*2	54 (29,5)	53 (28,2)	0,907	0,577-1,425	0,179	0,672
	*2/*2	7 (3,8)	3 (1,6)	0,396	0,100-1,566	1,858	0,173
	N	183	188			1,936 ²	0,380 ²

¹ Odhad relativního rizika (odds ratio, OR) a interval spolehlivosti (confidence interval, CI) pro tabulky 2x2 statistikou podle Mantel-Haenszela (jeden stupeň volnosti).

² Rozdělení genotypů testem Pearson Chi-Square 3x2 (dva stupně volnosti).

Tabulka č. 4: Vliv kombinací genů a genotypů na riziko CRC ve studii případů a kontrol.

Kombinace	kontroly	pacienti	OR ¹	95% CI ¹	P ¹
<i>GSTM1</i> -plus + <i>GSTP1</i> *1/*1	126	52	-	-	-
vs. <i>GSTM1</i> -null + <i>GSTP1</i> *1/*2					
nebo <i>GSTM1</i> -null + <i>GSTP1</i> *2/*2	154	92	1,448	0,957-2,189	0,049
N	280	144		3,085 ²	
<i>GSTT1</i> -plus + <i>GSTP1</i> *1/*1	212	114	-	-	-
vs. <i>GSTT1</i> -null + <i>GSTP1</i> *1/*2					
nebo <i>GSTT1</i> -null + <i>GSTP1</i> *2/*2	45	36	1,488	0,908-2,438	0,074
N	257	150		2,503 ²	
<i>GSTM1</i> -plus + <i>GSTT1</i> -plus	216	110	-	-	-
vs. <i>GSTM1</i> -null + <i>GSTT1</i> -null	322	202	1,232	0,922-1,645	0,090
N	538	312		1,999 ²	
<i>GSTM1</i> -plus + <i>GSTT1</i> -plus + <i>GSTP1</i> *1/*1	103	44	-	-	-
vs. <i>GSTM1</i> -null nebo <i>GSTT1</i> -null nebo <i>GSTP1</i> *1/*2 nebo					
<i>GSTP1</i> *2/*2	367	211	1,346	0,910-1,991	0,081
N	470	255		2,221 ²	

¹ Odhad relativního rizika (odds ratio, OR) a interval spolehlivosti (confidence interval, CI) pro tabulky 2x2 statistikou podle Mantel-Haenszela (jeden stupeň volnosti). Významnost byla hodnocena jednostranným Fisherovým testem, protože byly testovány pozitivní vs negativní kombinace s očekávaným efektem.

² Rozdělení genotypů testem Pearson Chi-Square 3x2 (dva stupně volnosti).

Korespondence: RNDr. Pavel Souček, CSc., Odborná skupina biotransformací, Centrum pracovního lékařství, Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, Praha 10, 100 42, tel: 267 082 711, fax: 267 311 236, e-mail: psoucek@szu.cz, www.szu.cz

leotidové primery byly získány od KRD s r.o. Další chemikálie byly zakoupeny od zastoupení firmy Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). PCR byla prováděna s pomocí termocyklérů GeneAmp 2400 a 9600 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) a PTC 200 DNA Engine Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA). Aparáty na elektroforézu nukleových kyselin byly produkty firmy Jordan Scientific Co. Inc. (Bloomington, IN, USA) a elektroforetické zdroje od firmy E-C Apparatus Corp. (Holbrook, NY, USA) dodávané firmou Biotech s r.o.

Donoři krevních vzorků. Vzorky žilní krve byly získány od 314 pacientů s CRC a od 591 kontrolních subjektů. Skupina pacientů byla shromážděna v období duben – listopad 2004. Účastníci studie byli nemocní s histologicky verifikovaným CRC, kteří podepsali informovaný souhlas s účastí ve studii. Vlastní krevní odběr byl prováděn při rutinní

dispenzární kontrole společně s odběrem nádorových markerů (u nemocných v remisi) nebo před aplikací chemoterapie. O pacientech byly od klinických spolupracovníků získány následující údaje: pohlaví, věk, etnická příslušnost, datum diagnózy, osobní a rodinná anamnéza, stadium onemocnění (Duke), lokalizace nádoru a jeho histologický typ a stupeň. V dalším průběhu studia budou sledovány i informace o charakteru neoadjuvantní i adjuvantní terapie, výsledky terapie, relapsy a jejich lokalizace, bezpříznakové i celkové přežívání. Jako hlavní expoziční faktor je sledována délka a rozsah kouření. Soubor pacientů byl složen ze 189 mužů a 125 žen (poměr 1,5) průměrného věku 64,8 let (rozpětí 30 – 92 let).

Kontrolní skupina byla složena ze 591 zdravých nepřibuzných jedinců kavkazské rasy (324 žen a 267 mužů, průměrný věk 57,3, rozpětí 11 - 105 let). Kontroly se skládaly z pacientů tří velkých pražských nemocnic a byli odebráni v období let 2000 – 2003. Ze zdravotní dokumentace byly získány údaje o věku, pohlaví, etnické příslušnosti a osobní anamnéze kontrolních subjektů. Hlavním kritériem pro přijetí do kontrolní skupiny byla prokazatelná absence nádorového onemocnění v osobní anamnéze.

Pacienti i kontrolní subjekty byly informováni o významu studie a byl jim předložen k podpisu formulář Informovaného souhlasu, který byl schválen etickými komisemi Státního zdravotního ústavu a Ústavu experimentální medicíny AV ČR.

Genotypování. Genomová DNA byla izolována z periferních lymfocytů za pomoci fenol/chloroformové extrakce podle Sugimury a spol. (28). Přítomnost polymorfismů biotransformačních enzymů byla stanovena publikovanými metodami přístupem restriční analýzy fragmentů získaných z DNA pomocí PCR (19, 29).

Odhad aktivity EPHX1 byl proveden podle dříve publikované metody (29) s pomocí kombinací genotypů v exonech 3 a 4 EPHX1 (exon 3 + exon 4), nízká aktivita: 3/*3+*1/*1, *3/*3+*1/*4, *1/*3+*1/*1 a *3/*3+*4/*4; střední: *1/*1+*1/*1, *1/*3+*1/*4 a *1/*3+*4/*4; vysoká: *1/*1 + *1/*4 a *1/*1 + *4/*4.

Statistické analýzy. V prvním sledu byly testovány rozdíly v rozložení genotypů mezi pacienty a kontrolami za pomoci kontingenčních tabulek 3x2 testem Pearson Chi-Square (2, oboustranný asymptotický test se dvěma stupni volnosti). Rovněž byly pro jednotlivé genotypy spočítány hrubé odhady relativního rizika (odds ratio, OR) z tabulek 2x2 podle Mantel-Haenszela.

V další fázi byl testován vliv věku a pohlaví s pomocí binární logistické regrese testem podle Hosmera a Lemeshowa a byly sledovány intervaly spolehlivosti na hladině 95% (95% confidence interval, CI).

V poslední sérii analýz byl analyzován vliv vybraných kombinací genů a genotypů. Následující kombinace byly vybrány na základě hypotézy o pozitivní vs. negativní kombinaci genotypů (u negativní kombinace očekáván jednosměrný efekt): EPHX1-aktivita + GSTM1, EPHX1-aktivita + GSTT1, EPHX1-aktivita + GSTP1, EPHX1-aktivita + NQO1, EPHX1-aktivita + CYP1B1, GSTM1 + GSTT1, GSTM1 + GSTP1, GSTM1 + CYP1B1, GSTM1 + NQO1, GSTT1 + GSTP1, GSTT1 + CYP1B1, GSTT1 + NQO1, GSTP1 + NQO1, GSTP1 + CYP1B1 a NQO1 + CYP1B1. Z důvodu testování předem dané hypotézy nebyla v výše zmíněných 15ti testů prováděna žádná korekce. Pro všechny statistické analýzy byl použit program Win SPSS v10.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). V případě, že v některé z testovaných skupin byl počet jedinců menší než 40 nebo pokud byl očekávaný výstup z kontingenčních tabulek menší než 5, byl pro zpřesnění výsledku dodatečně použit exaktní test podle Fishera. Za významný byl považován výsledek s hodnotou P nižší nebo rovnou 0.05. Výše uvedené analýzy jsou v souladu s postupy doporučenými Breslowem a Dayem (30).

Výsledky a diskuse

1. Frekvence alel a genotypů sledovaných genů u kontrolní české populace ve srovnání s jinými populacemi

Skupina zdravých nepřibuzných subjektů z české populace (n = 591) byla sestavena tak, aby byla vyvážená z hlediska zastoupení obou pohlaví i věkových skupin. U tohoto souboru byla zjištěna frekvence variantních alel CYP1B1*3 nesoucí Val - 41,8% a CYP1B1*4 nesoucí Ser - 16,0%. Rozdělení genotypů i frekvence variantních alel bylo srovnáno pomocí kontingenčních tabulek s údaji známými z literatury. U zdravé populace 1549 švédských žen byly popsány frekvence 45,2% a 16,9% (31). V britské populaci 593 kontrolních subjektů byla zjištěna frekvence CYP1B1*3 44,6% (12).

Studiem genotypů EPHX1 byly nalezeny frekvence alely nesoucí His v exonu 3 – 35,6% a alely nesoucí Arg v exonu 4 – 21,8%. Variantní alela *3 má o 50% nižší aktivitu a alela *4 naopak o 25% vyšší aktivitu než nativní protein (14). Proto je možné se pokusit o odhad aktivity EPHX1 kombinací sledovaných genotypů. Ve zdravé české populaci by tak bylo cca 17% nositelů vysoké aktivity a 40% nositelů nízké aktivity EPHX1. Tyto frekvence byly velmi podobné frekvencím zjištěným dříve ve zdravých populacích Evropy (29, 32).

Variantní alela v genu NQO1 nesoucí Ser byla zastoupena v české populaci 16,4%, což odpovídá frekvencím zaznamenaným ve švédské a německé populaci (33, 34).

Genotypováním GSTP1 byla zjištěna frekvence variantní alely nesoucí Val – 32,3%. Tato frekvence ani rozdělení genotypů se nelišilo od celé řady bělošských populací Evropy (29). Frekvence genotypů nesoucích delece v genech GSTM1 a GSTT1 byly v české populaci 52,5% a 16,9%, což jsou velice podobné výsledky jako dříve publikovaná data u slovenské a polské populace (35, 36).

Nalezený soulad v celkových frekvencích variantních alel ukázal, že použité metodiky byly dobře validovány a poskytly kvalitní údaje.

2. Analýza významu jednotlivých genotypů porovnáním skupiny pacientů se zdravou populací

Stanovení genetických polymorfismů bylo provedeno u skupiny pacientů trpících CRC (n = 314) a u zdravé kontrolní populace (n = 591), která byla vybrána tak, aby věkové i pohlavní složení bylo srovnatelné s pacienty. Statistická analýza výsledků provedená pomocí kontingenčních tabulek sledujících relativní riziko u neselektovaných skupin ukázala, že mezi pacienty a kontrolami nejsou významné rozdíly v rozdělení genotypů CYP1B1, EPHX1, NQO1, GSTM1, GSTP1 a GSTT1 (tabulka 1). Další analýza vlivu aktivity EPHX1 odhadnuté na základě kombinací stavu dvou polymorfismů v exonech 3 a 4 EPHX1 (29, 32) rovněž nenaznačila významné rozdíly mezi oběma skupinami (tabulka 2).

Úloha těchto polymorfismů již byla studována u řady populací avšak nikoliv u populace české. Rovněž velikost srovnávaných souborů se značně liší. Studií s dostatečnou statistickou silou nebylo zveřejněno mnoho. Studie Sachse a spol. (12) na 490 pacientech s CRC a 592 kontrolách britské národnosti neprokázala vliv polymorfismů CYP1B1*3, NQO1, GSTP1 a GSTT1 na CRC, avšak naznačila možnou protektivní úlohu pomalé alely EPHX1*3 (OR = 0,68; CI = 0,49–0,95; P = 0,012). Spojení vysoké aktivity enzymu se zvýšeným rizikem pokročilého adenomu kolorekta nedávno publikoval Huang a spol. (15) u 772 pacientů a 777 zdravých kontrol čínské národnosti. Negativní výsledky byly rovněž zveřejněny (16). Vysoká aktivita EPHX1 korelovala s vyšším rizikem CRC u kuřáků (37) a rovněž u konzumentů pečeného masa (OR = 3,3; CI = 1,4 - 7,9; cit. 38).

Glutathion S-transferázy P1 a T1 nekorelovaly s výskytem CRC v maďarské studii u 500 pacientů a 500 kontrol. Delece GSTM1 však byla označena jako rizikový faktor (OR = 1,48; CI = 1,15 – 1,92; cit. 39). Podobně silné studie holandské však žádný vztah GST k CRC nenalezly (16, 40).

Během analýz zohledňujících pohlaví a věk pacientů však byl

nalezen významný rozdíl v rozdělení genotypů *NQO1*. Podle těchto výsledků se zdá, že u pacientů s CRC ženského pohlaví převládají nositelky variantního genotypu *NQO1**2/*2 (tabulka 3), který kóduje enzymaticky neaktivní protein (41). Enzym *NQO1* katalyzuje dvouelektronovou redukci chinonů na hydrochinony. *NQO1* o chinony soupeří s NADPH-cytochrom P450 reduktázou, která jedoelektronovým mechanismem redukuje chinon na hydrochinon za vzniku velmi reaktivního meziprojektu – semichinonu a vedlejšího produktu superoxid anionradikálu (42). Chinony a jejich redukované formy - hydrochinony jsou mutageny, které tvoří adukty s DNA (43,44). Mutační spektra chinonů, semichinonů a hydrochinonů se navzájem liší ve frekvenci i specificitě. *NQO1* tak vlastně ochraňuje buňky před mutagenitou chinonů a především semichinonů i následně vznikajících reaktivních forem kyslíku. Nositelé variantního genotypu nemají funkční *NQO1* a proto při současné expozici chinonům, např.: produkty metabolismu benzenu, polycyklických aromatických uhlovlodíků, ale i autooxidace polyfenolů, mohou být vystaveni zvýšené mutageně a karcinogenezi.

Hou a spol. (21) nalezi v 725 pacientů a 729 kontrol kombinaci alel *NQO1**2 a *CYP1A1**2 jako rizikový faktor CRC (OR = 2,2; CI = 1,1 – 4,5). Vztah byl velmi významný především u těžkých kuřáků, kteří měli spotřebu nad 20 cigaret na den (OR = 21,1; CI = 3,9 – 114,4; P = 0,03). Multivariantní analýzy španělské populace složené z 247 CRC pacientů a 296 kontrol ukázaly významnou úlohu variantní alely *NQO1**2 jako rizikového faktoru v CRC (OR = 2,9; CI = 1,19 – 6,97; P = 0,01) a navíc byla tato alela spojena se zvýšenou frekvencí mutací v kodonu 12 genu *K-ras* (OR = 6,5; CI = 1,39 – 34,9; P = 0,003; cit. 18). Pohlavní rozdíly spojené s polymorfismem *NQO1* byly publikovány u rakoviny plic, kde ženy s alespoň jednou variantní alelou *NQO1*, na rozdíl od mužů, měly významně vyšší riziko onemocnění (OR = 1,89; CI = 1,33 – 2,68; cit. 45). Pohlavní rozdíly mohou souviset s rozdílnou expozicí mezi muži a ženami (především faktory výživy) či hormonálními vlivy uvnitř organismu.

S pomocí logistické regrese bylo zjištěno, že žádný ze sledovaných vztahů nebyl významně ovlivněn věkovým rozdělením v obou sledovaných skupinách.

3. Analýza významu kombinací genů porovnáním skupiny pacientů se zdravou populací

Analýzy patnácti vybraných kombinací dvou genů byly zjištěny zajímavé, i když nevýznamné vlivy všech tří možných kombinací genů *GSTM1*, *GSTP1* a *GSTT1* (tabulka 4). Tyto kombinace byly vybrány na základě hypotézy o negativní vs. pozi-

itivní kombinaci polymorfismů. Negativní kombinace by podle hypotézy znamenala sníženou detoxikaci, a tudíž zvýšené riziko interakce reaktivních metabolitů např.: polycyklických aromatických uhlovlodíků a dalších kontaminantů životního prostředí s biomakromolekulami oproti normálnímu stavu.

Kombinace výše uvedených genů nebyly jako rizikové faktory zatím v literatuře uvedeny, avšak kombinace *GSTM1-null* a přítomnosti aspoň jedné variantní alely *GSTM3**B byla označena jako významný rizikový faktor CRC (OR = 2,12; CI = 1,24 – 3,63; cit. 46). Jedinci s kombinací *GSTM1-null* a *GSTP1**2 mají vyšší riziko vzniku rakoviny plic (OR = 4,0; CI 1,3 – 12,2; cit. 47). Velmi podobné zjištění publikovali Wenzlaff a spol. (48). Významný vztah této kombinace byl rovněž nalezen u rakoviny prsu (OR = 2,03; CI = 1,18 – 3,50; P = 0,010; cit. 20).

Naše předchozí zjištění dále podporuje vztah na hranici významnosti, který byl nalezen u kombinace všech tří genů *GST* (OR = 1,346; 0,910 - 1,991; 0,081; tabulka 4).

Závěry

Analýza polymorfismů v genech kódujících enzymy biotransformace v české populaci ukázala, že mohou existovat pohlavní rozdíly v riziku CRC. Ze studovaných genů se v tomto ohledu zdá být nejzajímavějším *NQO1*, který detoxikuje látky se strukturálním motivem chinonů. Expozice těmto látkám současně s defektem v uvedeném genu může znamenat zvýšené riziko vzniku nádorových onemocnění obecně. Pro další studium zůstává otázkou proč jsou právě ženy ohroženější ve srovnání s muži. V tomto ohledu bude třeba prostudovat hormonální poměry v organismu, například délku menstruační aktivity a používání exogenních hormonálních látek typu hormonální antikoncepce apod.

Dalšími rizikovými faktory CRC se zdají negativní kombinace konjugčních enzymů *GST*. Tyto kombinace se mohou uplatnit zejména při interakci s faktory životního stylu (kouření, spotřeba pečeného masa či zeleniny). Tyto předpoklady je třeba ověřit studiem dobře charakterizovaného souboru s ohledem na životní styl pacientů i kontrolních subjektů. Na podobné studii v současnosti pracujeme.

Poděkování

Studie byla podpořena grantem Ligy proti rakovině Praha pro rok 2004-2005 a grantem Grantové agentury ČR, číslo: 310/05/2626. Autoři by rádi poděkovali personálu klinických pracovišť, která dodávají vzorky i data, a především pacientům za ochotu podporovat tento výzkum.

Literatura

1. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 2002;137:603-12
2. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *Br Med J.* 2000;321:805-8.
3. Janout V and Kollarova H (2001) *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc.*
4. Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, et al. Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. IARC Scientific Publication no. 148. IARC, Lyon, France, 1999.
5. Raunio H, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Hietanen E, et al. Diagnosis of polymorphism in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility - a review. *Gene* 1995;159:113-21.
6. Tang YM, Wo YY, Stewart J, Hawkins AL, et al. Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J Biol Chem.* 1996;271:28324-30.
7. Tuominen R, Warholm M, Moller L, Rannug A. Constitutive CYP1B1 mRNA expression in human blood mononuclear cells in relation to gender, genotype, and environmental factors. *Environ Res.* 2003;93:138-48.
8. Guengerich FP, Shimada T. Activation of procarcinogens by human cytochrome P 450 Enzymes. *Mutat Res.* 1998;400:201-13.
9. Stoilov I, Akarsu AN, Alozie I, Child A, et al. Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21

- results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1. *Am J Hum Genet.* 1998;62:573-84.
10. Shimada T, Watanabe J, Inoue K, Guengerich FP, et al. Specificity of 17beta-oestradiol and benzo[a]pyrene oxidation by polymorphic human cytochrome P4501B1 variants substituted at residues 48, 119 and 432. *Xenobiotica* 2001;31:163-76.
11. Bandiera S, Weidlich S, Harth V, Broede P, et al. Proteasomal degradation of human CYP1B1: effect of the Asn453Ser polymorphism on the post-translational regulation of CYP1B1 expression. *Mol Pharmacol.* 2005;67:435-43.
12. Sachse C, Smith G, Wilkie MJ, Barrett JH, et al. Colorectal Cancer Study Group. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2002;23:1839-49.
13. Oesch F. Mammalian epoxide hydrolases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica* 1973;3:305-40.
14. Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet.* 1994;3:421-8.
15. Huang WY, Chatterjee N, Chanock S, Dean M, et al. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and risk for advanced colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:152-7.

16. Tiemersma EW, Bunschoten A, Kok FJ, Glatt H, et al. Effect of SULT1A1 and NAT2 genetic polymorphism on the association between cigarette smoking and colorectal adenomas. *Int J Cancer*. 2004;108:97-103.
17. Traver RD, Siegel D, Beall HD, Phillips RM, et al. Characterization of a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *Br J Cancer* 1997;75:69-75.
18. Lafuente MJ, Casterad X, Trias M, Ascaso C, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase-dependent risk for colorectal cancer and its association with the presence of K-ras mutations in tumors. *Carcinogenesis*. 2000;21:1813-9.
19. Šarmanová J, Šušová S, Gut I, Mrhalová M, et al. Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *Eur J Hum Genet*. 2004;12:848-54.
20. Menzel H-J, Sarmanova J, Soucek P, Berberich R, et al. Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *Br J Cancer* 2004;90:1989-94.
21. Hou L, Chatterjee N, Huang WY, Baccarelli A, et al. CYP1A1 Val462 and NQO1 Ser187 polymorphisms, cigarette use, and risk for colorectal adenoma. *Carcinogenesis*. 2005;26:1122-8.
22. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, et al. Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300:271-6.
23. Ates NA, Tamer L, Ates C, Ercan B, et al. Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem Genet*. 2005;43:149-63.
24. Yeh CC, Hsieh LL, Tang R, Chang-Chieh CR, et al. Vegetable/fruit, smoking, glutathione S-transferase polymorphisms and risk for colorectal cancer in Taiwan. *World J Gastroenterol*. 2005;11:1473-80.
25. Board PG, Webb GC, Coggan M. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome band 11q13 and 12q13-14. *Ann Hum Genet* 1989;53: 205-13.
26. Zimniak P, Nanduri B, Pikula S, Bendorowicz-Pikula J, et al. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 1994;224:893-9.
27. Stoechlacher J, Park DJ, Zhang W, Yang D, et al. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:344-54.
28. Sugimura H, Caporaso NE, Shaw GL, Modali RV, et al. Human debrisoquine hydroxylase gene polymorphisms in cancer patients and controls. *Carcinogenesis* 1990;11:1527-30.
29. Šarmanová J, Týnková L, Šušová S, Gut I, Souček P. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes: allele frequencies in the population of the Czech Republic. *Pharmacogenetics* 2000;10:781-8.
30. Breslow NE, Day NE. In: *Statistical methods in cancer research*, Vol.1, Lyon, France, IARC, 362-71, 1980.
31. Rylander-Rudqvist T, Wedren S, Jonassdottir G, Ahlberg S, et al. Cytochrome P450 1B1 gene polymorphisms and postmenopausal endometrial cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13:1515-20.
32. Benhamou S, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, et al. Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Res*. 1998;58:5291-3.
33. Sanyal S, Festa F, Sakano S, Zhang Z, et al. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis*. 2004;25:729-34.
34. Sarbia M, Bitzer M, Siegel D, Ross D, et al. Association between NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) inactivating C609T polymorphism and adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer*. 2003;107:381-6.
35. Gawrońska-Szklarz B, Lubiński J, Kładny J, Kurzawski G, et al. Polymorphism of GSTM1 gene in patients with colorectal cancer and colonic polyps. *Exp Toxicol Pathol* 1999;51:321-5.
36. Šalagovič J, Kalina I, Štubňa J, Habalová V, et al. Genetic polymorphism of glutathione S-transferases M1 and T1 as a risk factor in lung and bladder cancers. *Neoplasma* 1998;45:312-7.
37. Cortes V, Siegmund K, Chen Q, Zhou N, et al. A case-control study of microsomal epoxide hydrolase, smoking, meat consumption, glutathione S-transferase M3, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res*. 2001;61:2381-5.
38. Ulrich CM, Bigler J, Whitton JA, Bostick R, et al. Epoxide hydrolase Tyr113His polymorphism is associated with elevated risk of colorectal polyps in the presence of smoking and high meat intake. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10:875-82.
39. Kiss I, Nemeth A, Bogner B, Pajkos G, et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase and arylamine N-acetyltransferase enzymes and susceptibility to colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2004;24:3965-70.
40. van der Logt EM, Bergevoet SM, Roelofs HM, van Hooijdonk Z, et al. Genetic polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases and glutathione S-transferases and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2004;25:2407-15.
41. Siegel D, McGuinness SM, Winski SL, Ross D. Genotype-phenotype relationships in studies of a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase I. *Pharmacogenetics* 1999;9:113-121.
42. Joseph P, Jaiswal AK. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 reduces the mutagenicity of DNA caused by NADPH:P450 reductase-activated metabolites of benzo(a)pyrene quinones. *Br J Cancer* 1998;77:709-19.
43. Lin PH, Nakamura J, Yamaguchi S, Upton PB, et al. Oxidative damage and direct adducts in calf thymus DNA induced by the pentachlorophenol metabolites, tetrachlorohydroquinone and tetrachloro-1,4-benzoquinone. *Carcinogenesis* 2001;22:627-34.
44. Arif JM, Lehmler HJ, Robertson LW, Gupta RC. Interaction of benzoquinone- and hydroquinone-derivatives of lower chlorinated biphenyls with DNA and nucleotides in vitro. *Chem Biol Interact* 2003;142:307-16.
45. Saldivar SJ, Wang Y, Zhao H, Shao L, et al. An association between a NQO1 genetic polymorphism and risk of lung cancer. *Mutat Res*. 2005;582:71-8.
46. Loktionov A, Watson MA, Gunter M, Stebbings WS, et al. Glutathione-S-transferase gene polymorphisms in colorectal cancer patients: interaction between GSTM1 and GSTM3 allele variants as a risk-modulating factor. *Carcinogenesis*. 2001;22:1053-60.
47. Cote ML, Kardia SL, Wenzlaff AS, Land SJ, et al. Combinations of glutathione S-transferase genotypes and risk of early-onset lung cancer in Caucasians and African Americans: a population-based study. *Carcinogenesis*. 2005;26:811-9.
48. Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, Land SJ, et al. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms, environmental tobacco smoke exposure and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis*. 2005;26:395-401.

informace

Srdečně Vás zveme na
přednášku/workshop

Psychické aspekty onkologických onemocnění 18. – 19. 11. 2005, Praha

pod vedením vynikajícího německého odborníka v oblasti psychoonkologie
profesora **Volкера Tschuschke**.

Témata:

- psychoonkologie – aktuální otázky oboru a jeho rostoucí význam
- vliv psychosociálních faktorů na vznik a průběh nádorových onemocnění
- vhodné metody psychosociální intervence u nádorových onemocnění
- psychické aspekty práce s onkologicky nemocnými a jejich rodinami
- kazuistiky, diskuze

Workshop je určen pro lékaře, sestry, psychology a další odborníky, kteří pracují s onkologicky nemocnými, a pro studenty.

Centrum dohody, V Hůrkách 1292/8, 158 00 Praha 5
office@centrumdohody.com
www.centrumdohody.com