



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**POROVNÁNÍ SEKVENČNÍCH VARIANT
GENŮ PRO BIOTRANSFORMAČNÍ
ENZYMY U RŮZNÝCH TYPŮ KARCINOMŮ**
COMPARISON OF SEQUENCE VARIATIONS IN GENES OF
BIOTRANSFORMATION ENZYMES IN SOME CARCINOMA

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. Lucie Turková

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Arpád Bóday

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: FCH-DIP1070/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Lucie Turková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Arpád Bóday**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Porovnání sekvenčních variant genů pro biotransformační enzymy u různých typů karcinomů

Zadání diplomové práce:

Cíle diplomové práce:

1. Rešerše zaměřená na charakterizaci enzymů účastnících se metabolismu xenobiotik a jejich úlohu v organismu.
2. Experimentální práce – stanovení frekvence polymorfismů vybraných genů v běžné populaci a v populaci s vybranými typy nádorů.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Lucie Turková
Studentka

Ing. Arpád Bóday
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně dne 31.1. 2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan

ABSTRAKT

Biotransformační aparát a jeho kapacita hrají významnou roli ve vyrovnávání se s environmentálními faktory negativně působícími na buněčné struktury. Enzymy účastníci se tohoto procesu jsou v závislosti na genech, které je kódují, různě účinné. Cílem práce bylo srovnat frekvence konkrétních polymorfismů vybraných genů u nádorových skupin pacientů a u zdravých kontrol. Sledovanými polymorfismy byly null genotypy genů pro glutathion-S transferázu M1 a T1 a inserce TA dinukleotidu v promotorové sekvenci genu pro UDP-glukuronosyl transferázu 1A1. Nádorových skupin, kde byly tyto polymorfismy sledovány, bylo celkem šest – kolorektální karcinomy, karcinomy plic, prostaty, prsu, pankreatu a hlavy a krku. Celkem byly zmíněné polymorfismy vyšetřeny na 1 118 pacientech a 470 zdravých kontrolách. Kontrolní skupiny byly dvě – první obecná a druhá speciální, do které byli zařazeni pouze zdraví jedinci starší šedesáti let bez výskytu nádorového onemocnění u jejich nejbližších příbuzných.

Gilbertův syndrom (GS), jehož příčinou je homozygotní inserce TA dinukleotidu v sekvenci TATA boxu promotorové oblasti UGT1A1, má za následek zvýšenou hladinu celkového bilirubinu v krvi. Cílem bylo ověřit, zda má bilirubin protektivní účinek proti vzniku nádorového onemocnění. Bylo očekáváno, že frekvence Gilbertova syndromu, jakožto protektivního faktoru, bude u nádorových skupin statisticky významně nižší než u zdravých kontrol. Tato hypotéza se potvrdila pouze u pacientů s nádorem prsu (frekvence GS 10,0 %) a u pacientů s nádory pankreatu (frekvence GS 11,1 %). V kontrolní skupině I byla frekvence GS 16,0 %, v kontrolní skupině II pak 15,4 %. U ostatních nádorových skupin byla sice frekvence GS vždy nižší oproti kontrolním skupinám, ne však statisticky významně.

Null genotyp genu pro GSTM1 byl v kontrolní skupině I zjištěn u 50,4 % jedinců, v kontrolní skupině II u 55,3 % jedinců. Žádná z nádorových skupin nevykazovala statisticky vyšší frekvenci výskytu tohoto null genotypu. U pacientů s nádory plic (37,4 %) a pankreatu (39,3 %) byla naopak frekvence statisticky významně nižší. Deficience enzymu glutathion-S transferázy M1 tak dle těchto výsledků nemůže být považována ve studovaných skupinách za rizikový faktor pro vznik nádorového onemocnění.

Null genotyp genu pro GSTT1 nebyl identifikován v žádné z kontrolních skupin, ve skupině s nádory prsu a prostaty byl pak identifikován pouze v jednom případě. Statisticky významně vyšší frekvence null genotypu byla pozorována u pacientů s kolorektálním karcinomem (9,7 %), karcinomem plic (17,2 %), karcinomem pankreatu (3,0 %) a karcinomem hlavy a krku (15,9 %). V těchto nádorových skupinách tak lze deficienci glutathion-S transferázy T1 považovat za rizikový faktor pro nádorovou transformaci buněk. Pro další potvrzení této hypotézy by však bylo vhodné provést vyšetření na větší skupině pacientů, zejména pak u nádorů hlavy a krku, plic a pankreatu.

Klíčová slova

UDP-glukuronosyl transferáza 1A1, glutathion-S-transferázy, biotransformace xenobiotik, oxidační stres, kancerogeneze

ABSTRACT

Xenobiotic biotransformation process and its capacity is crucial for xenobiotic chemicals elimination that may cause damage toward cell structures. The effectiveness of the enzymes included in this process depends on the gene variants that encodes them. The aim of this work was to compare certain polymorphisms of selected genes between cases and control groups. Studied polymorphisms were null genotypes of the glutathione S-transferase gene M1 and T1 and the insertion of TA dinucleotide in the promotor region of UDP-glucuronosyl transferase 1A1. The number of cases group was six included patients with colorectal, lung, prostate, breast, pancreatic and head and neck cancer. Total number of analysed individuals was 1 118 for cancer cases and 470 for healthy controls. The control group was divided into two groups, the first one was called general and the second one was called special included healthy individuals with no cancer history in their closest family members.

Gilbert syndrome (GS) is caused by homozygous insertion of the TA dinucleotide in the TATA box of the gene UGT1A1 and it causes elevated bilirubin levels. Bilirubin is a potent antioxidant in human body, so the aim was to attest its protective effect toward cancer. We expected lower frequency of GS as a protective factor in the cases groups compared with controls. This hypothesis was confirmed in the breast cancer group (GS frequency 10,0 %) and pancreatic cancer group (GS frequency 11,1 %). In the general and special control groups the frequency of GS was 16,0 % and 15,4 % respectively. Although the other case groups show lower frequency of GS, the results weren't statistically significant.

Null GSTM1 genotype was observed with 50,4 % frequency in the general control groups and with 55,3 % frequency in the special control group. Neither the one of the cases groups hasn't showed significantly lower percentage of null genotype. Despite expectation we observed statistically significant lower frequency of null genotype in the group of lung and pancreatic cancer group (37,4 % and 39,3 % respectively). According to this study, we can say that the lack of glutathione S-transferase M1 activity is not a risk factor for cancer development.

Null genotype of GSTT1 wasn't identified in both control groups at all. In case groups of breast and prostate cancer, there was only one individual carrying the null GSTT1 genotype. Statistically significant higher frequency of this polymorphism was observed in patients with colorectal cancer (9,7 %), lung cancer (17,2 %), pancreatic cancer (3,0 %) and head and neck cancer (15,9 %). In these groups the lack of glutathion S-transferase T1 activity might be considered as risk factor for cancer development. Nevertheless, for further verification it needs to take more investigation in this field, especially enlarge the number of patient in the case groups of head and neck, lung and pancreatic cancer.

Key words

UDP-glukuronosyl transferases, glutathion-S-transferases, xenobiotics biotransformation, oxidative stress, cancerogenesis

TURKOVÁ, L. *Porovnání sekvenčních variant genů pro biotransformační enzymy u různých typů karcinomů*, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 72 s.
Vedoucí diplomové práce: Ing. Arpád Bóday

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rodině. Bez ní bych nebyla tím, kým jsem.

Mému vedoucímu Arpádu Bódayovi za to, že se ve svém volném čase věnuje studentům, mezi které jsem měla to štěstí zařadit se i já. Za to, že nám předává své zkušenosti a znalosti a to vše s nemalou dávkou vtipu a lehkosti jemu vlastní.

Paní profesorce Ivaně Márové za to, že mi umožnila vypracovat diplomovou práci mimo půdu fakulty a vyřešila všechny formální náležitosti s tím spojené.

Kolektivu laboratoře molekulární biologie za pomoc a rady při práci v laboratoři.

A přátelům, kteří tvoří moji druhou rodinu.

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Xenobiotika	10
2.2	Metabolismus xenobiotik	10
2.2.1	Osud xenobiotik v organismu	10
2.2.2	První fáze.....	13
2.2.2.1	Hydrolyza.....	13
2.2.2.2	Redukce.....	15
2.2.2.3	Oxidace	16
2.2.3	Druhá fáze	18
2.2.3.1	Glukurodinace	18
2.2.3.2	Konjugace glutathionu	20
2.2.3.3	Sulfatace.....	20
2.2.3.4	Acetylace.....	21
2.2.3.5	Metylace.....	22
2.2.3.6	Konjugace aminokyselin.....	22
2.3	Kancerogeneze.....	23
2.3.1	Mutace DNA	24
2.3.1.1	Spontánní mutace.....	25
2.3.1.2	Indukované mutace	25
2.3.2	Oxidační stres.....	27
2.4	Bilirubin.....	29
2.4.1	Chemické a fyzikální vlastnosti	29
2.4.2	Degradace hemu	30
2.4.3	Transport bilirubinu.....	32
2.4.4	Konjugace s kyselinou glukuronovou	32
2.4.5	Vyloučení konjugovaného bilirubinu.....	32
2.4.6	Funkce bilirubinu v organismu	33
2.5	UDP-glukuronosyl transferázy (UGT)	33
2.5.1	Gen UGT1A	34
2.5.2	Gilbertův syndrom.....	35
2.5.3	Protektivní role Gilbertova syndromu proti vzniku nádorů	36

2.6	Glutathion S-transferázy.....	37
2.6.1	Polymorfismy glutathion S-transferáz	38
2.6.2	Deficience GSTM, GSTT a vznik nádorů.....	39
3	Cíl práce	40
4	Experimentální část.....	41
4.1	Biologický materiál	41
4.2	Chemikálie a přístrojové vybavení	41
4.2.1	Chemikálie	41
4.2.2	Komponenty pro PCR a sekvenování	41
4.2.3	Přístroje a pomůcky.....	42
4.3	Metody.....	42
4.3.1	Izolace DNA z periferní krve	42
4.3.2	Izolace DNA z nativní tkáně	42
4.3.3	Stanovení koncentrace DNA.....	43
4.3.4	Gilbertův syndrom.....	43
4.3.5	Sekvence promotorové oblasti genu UGT1A1.....	44
4.3.6	Detekce delecí genů pro GSTM1 a GSTT1	45
5	Výsledky.....	47
5.1	Gilbertův syndrom.....	47
5.2	Null alely GSTM1 a GSTT1	47
5.2.1	Frekvence polymorfismů v genech pro UGT1A1, GSTM1, GSTT1.....	48
5.2.1.1	Obecná kontrolní skupina (KS I)	48
5.2.1.2	Speciální kontrolní skupina (KS II)	50
5.2.1.3	Kolorektální karcinom	50
5.2.1.4	Karcinom pankreatu	51
5.2.1.5	Karcinom prsu.....	52
5.2.1.6	Karcinom prostaty.....	53
5.2.1.7	Karcinom plic.....	54
5.2.1.8	Karcinom hlavy a krku.....	55
5.2.2	Souhrnné výsledky pro gen UGT1A1	56
5.2.3	Souhrnné výsledky pro null genotypy GSTM1 a GSTT1	60
6	Závěr.....	63
7	Bibliografie.....	65

8	Přílohy	70
8.1	Elektroforegramy sekvenací promotorové oblasti genu UGT1A1	70
9	Seznam použitých zkratek.....	72

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění patří k nejčastějším příčinám úmrtí nejen v rozvinutých zemích. Podle dat Světové zdravotnické organizace ročně zemře na následky rakoviny 8,8 milionů lidí, což tvoří 16 % všech úmrtí (data za rok 2015). Nádorová onemocnění jsou těžkým břemenem pro pacienta a jeho rodinu, zároveň tvoří také socioekonomickou zátěž pro společnost (prostředky vynaložené na léčbu se odhadují na 1,16 bilionů dolarů ročně). Oba tyto aspekty vedou ke snaze předcházet tomuto druhu onemocnění. Odborné zdroje totiž uvádějí, že 30-50 % nádorových onemocnění lze předejít vyhýbáním se rizikovým faktorům, mezi které patří zejména nevhodná strava, kouření, nadměrná konzumace alkoholu, nedostatek fyzické aktivity nebo některé virové infekce.

Nádory vznikají transformací normálních buněk v buňky tumorové v několika stupňovém procesu. Změny, které nádorovou transformaci způsobují, nazýváme karcinogenními faktory a můžeme je rozdělit na tři hlavní skupiny: fyzikální, chemické a biologické. Obsah této práce je zaměřen na metabolismus látek zvaných xenobiotika, mezi něž zařazujeme i chemické kancerogeny. Těmi mohou být průmyslové látky (barviva, rozpouštědla), kontaminanty potravin (aflatoxiny), látky obsažené v cigaretovém kouři apod. Metabolické procesy, které zajišťují vyloučení těchto škodlivých látek z těla, jsou závislé na efektivitě enzymů, které eliminační proces katalyzují. V genech pro tyto enzymy bylo nalezeno mnoho polymorfismů, které mají dopad na výslednou efektivitu odbourání xenobiotik. Mutace, které způsobují sníženou efektivitu vylučování xenobiotik, mohou být pro daného jedince rizikovým faktorem pro vznik nádorového onemocnění. Tato práce se snaží zhodnotit vliv určitých variant genů pro biotransformační procesy na vznik nádorových onemocnění. První z teorií, která je předmětem srovnávání, je zvýšená hladina celkového bilirubinu v krvi, způsobená Gilbertovým syndromem, jako protektivního faktoru proti vzniku nádorového onemocnění. Na druhé straně bylo cílem srovnat také deficienci glutathion S-transferáz jako rizikového faktoru.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Xenobiotika

Xenobiotika v užším pojetí smyslu zahrnují chemické látky vznikající lidskou činností vykazující převážně škodlivé účinky na zdraví jedince. Jako příklad lze uvést dioxiny, polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly apod. V širším slova smyslu pak označují každou chemickou látku, s níž živý organismus přichází do styku a kterou sám není schopen v rámci svého metabolického systému produkovat. Tuto definici pak splňují vedle výše zmíněných látek také například antibiotika produkovaná řadou mikroorganismů v rámci konkurenčního boje, sekundární metabolity rostlin, syntetické i přírodní látky užívané jako léčiva nebo pyrolytické produkty v tepelně upravených potravinách. Látky vyhovující tomuto širšímu pojetí ale nemusí nutně vykazovat negativní dopad na organismus, který s nimi přichází do styku. Touto druhou definicí je pak lépe naplněn charakter látek označovaných jako xenobiotika, neboť název vychází z řeckého „xenos“ znamenající cizí či odlišný a „bios“ jako život. V celé práci je výraz xenobiotikum užíván pro látky, které odráží spíše širší pojetí tohoto výrazu. [1]

2.2 Metabolismus xenobiotik

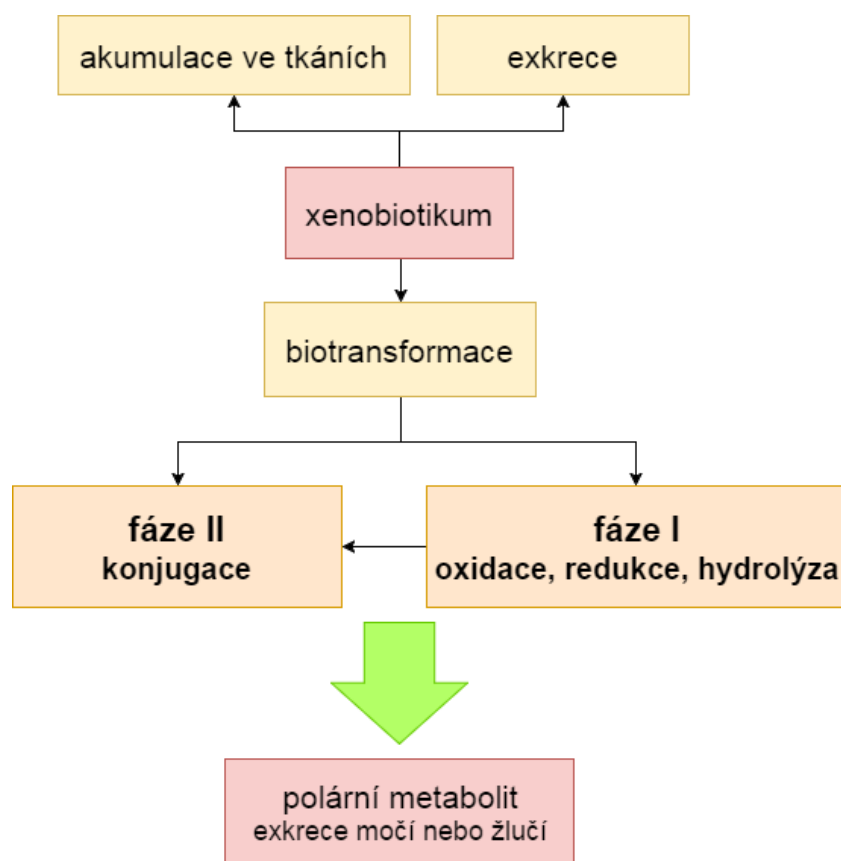
Xenobiotikům je nevyhnutelně vystaven každý organismus, v průběhu evoluce tak došlo k vývoji metabolického aparátu, díky kterému je v různé míře každý organismus schopen tyto látky vyloučit a eliminovat tak jejich potenciálně škodlivý vliv. Schopnost vypořádat se s xenobiotiky závisí na kombinaci genetických, fyziologických a patofyziologických faktorů jedince. První významnější objevy zabývající se zhoršenými reakcemi na podané léky, které jako příčinu udávaly geneticky podmíněnou variabilitu biotransformačních enzymů, byly popsány v padesátých letech 19. století, kdy byl zaveden také pojem farmakogenetika. Později s poznáním struktury DNA a vývojem metod jejího studia byla tato hypotéza potvrzena a dále studována. Byly objeveny genetické varianty biotransformačních enzymů a postupně definován jejich dopad na citlivost jedince vůči látkám, kterým je vystaven. [2]

2.2.1 Osud xenobiotik v organismu

Společnou vlastností mnoha xenobiotik je jejich *lipofilní* charakter. Díky němu mohou být snadno absorbovány kůží, dýchacím či trávicím ústrojím. Volnou difúzí procházejí přes fosfolipidovou membránu buněk a v krvi jsou přenášeny pomocí transportních proteinů. Právě díky lipofilnímu charakteru a vazbě na proteiny je znemožněna jejich exkrece z organismu. Úkol biotransformačního aparátu pak často spočívá právě v převedení těchto látek na ve vodě rozpustné sloučeniny, které mohou být snadno vyloučeny. Cizorodé látky hydrofilního charakteru se v krvi vyskytují volně a mohou být snadno exkretovány močí. Do buněk pronikají jen přes transportní kanály. Schopnost látky procházet plazmatickou membránou je charakterizována rozdělovacím koeficientem definovaným jako podíl koncentrace látky v oktanolu (lipidické fázi) a ve vodě (vodné fázi):

$$P = \frac{c(L)}{c(V)},$$

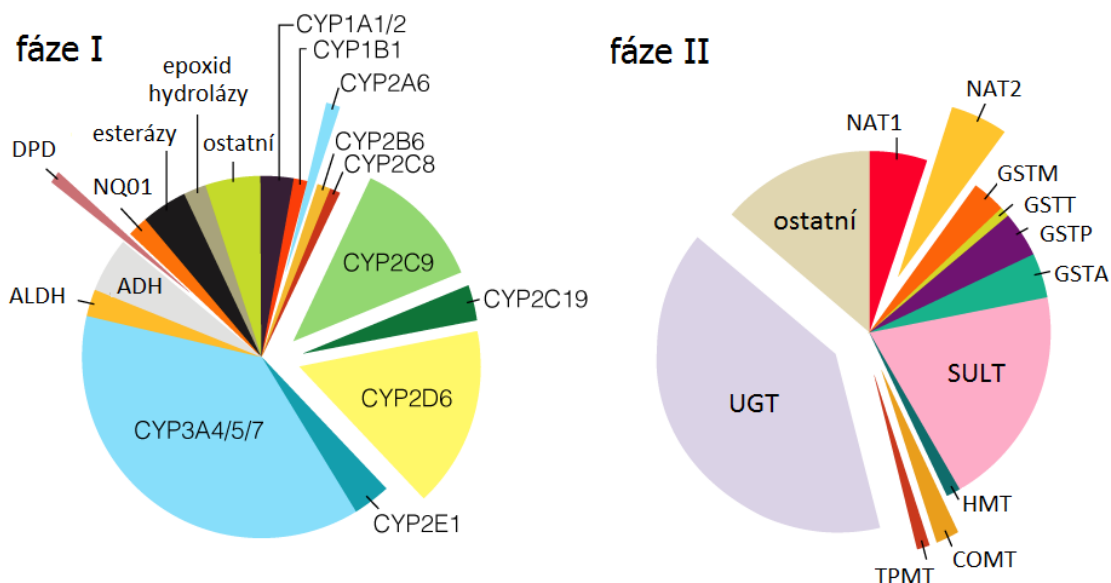
čím vyšší je poměr, tím snadněji látka difunduje membránou. [3] [4]



Obrázek 1 - Osud xenobiotik po vstupu do organismu [5]

Biotransformací cizorodých látek dochází také ke zvýšení či snížení jejich biologické aktivity, nebo se biologická aktivita nemění. Zvýšení se užívá ve farmacii, kdy jsou některá léčiva podávána ve formě proléku a až jejich metabolickou přeměnou vzniká aktivní produkt s farmakologickým účinkem. Biotransformací se ale také některé původně intaktní látky mění v toxické metabolity (methanol/formaldehyd). Tento efekt je však minoritní a ve většině případů metabolizace xenobiotik eliminuje škodlivé látky a zabraňuje tak jejich negativním účinkům. [4]

Některé látky jako například etanol jsou schopny kompletní metabolizace až na oxid uhličitý a vodu, jiné látky podstoupí jen biotransformaci na snadněji vyloučitelné produkty. Na celém procesu se podílí více než 30 druhů enzymů, z nichž většinu řadíme mezi enzymy konstitutivní, přičemž některé z enzymů biotransformačních reakcí se podílejí zároveň na metabolismu endogenních látek. Jednotlivé typy biotransformačních enzymů a jejich podíl na metabolizaci xenobiotik znázorňuje obrázek 2. Biotransformační proces se rozděluje na dvě části – biotransformační a konjugační respektive první a druhou fázi biotransformace xenobiotik. Všechny cizorodé látky nemusí nutně projít oběma fázemi biotransformace. Reakce a enzymové systémy, které budou xenobiotikum metabolizovat, se liší v závislosti na koncentraci a vlastnostech xenobiotika, aktivitě a koncentraci příslušných enzymů a dostupnosti kofaktorů nutných pro reakce. Daná látka tedy při opakovaném vstupu do stejného organismu nemusí projít totožnou transformační cestou. [1] [6]



Obrázek 2 - Podíl jednotlivých typů enzymů na biotransformačním procesu. Enzymy, jejichž kruhová výše leží mimo kruh, vykazují polymorfismy ovlivňující jejich aktivitu. Jsou jimi CYP: cytochromy P450, DHD: dihydropyrimidin dehydrogenáza, ADH: alkohol dehydrogenáza, ALDH: aldehyd dehydrogenáza TPMT: thiopurin methyltransferáza, COMT: katechol o-methyltransferáza, N-acetyl transferáza, UDP-glukuronosyl transferáza [7]

Lokalizace biotransformačních enzymů

Enzymy biotransformace jsou přítomny prakticky ve všech tkáních těla. Nejintenzivnější metabolizace cizorodých látek však probíhá v játrech, kde se potřebných enzymů vyskytuje nejvíce. Dalšími orgány, které v menší, ale nezanedbatelné míře odbourávají xenobiotika, jsou přirozeně tkáně, které jsou těmto látkám přímo vystaveny tj. kůže, plíce, nosní sliznice a gastrointestinální trakt. Z dalších tkání je třeba zmínit ještě ledviny, slinivku břišní, srdce, mozek, varlata či placentu. Ve většině těchto tkání jsou biotransformační enzymy lokalizovány především v mikrozomech nebo cytosolu v menší míře pak v mitochondriích, jádře a lysozomech (viz Tabulka 1). Důležitým systémem odbourání cizorodých látek je také střevní mikroflóra. [6] [8]

Tabulka 1 - Enzymy biotransformace xenobiotik a jejich lokalizace v buňce [6]

reakce	enzym	lokalizace v buňce
<i>fáze I</i>		
<i>hydrolýza</i>	esterázy	mikrozomy, cytosol, lysozomy, krev
	peptidázy	krev, lysozomy
	epoxid hydrolázy	mikrozomy, cytosol
<i>redukce</i>	azo a nitro redukce	mikroflóra, mikrozomy, cytosol
	karbonyl redukce	cytosol, krev, mikrozomy
	disulfid redukce	cytosol
	sulfoxid redukce	cytosol
	chinon redukce	cytosol, mikrozomy
	redukční dehalogenace	mikrozomy

<i>oxidace</i>	alkohol dehydrogenázy	cytosol
	aldehyd dehydrogenáza	mitochondrie, cytosol
	aldehyd oxidázy	cytosol
	xanthin oxidázy	cytosol
	monoamin oxidázy	mitochondrie
	diamin oxidázy	cytosol
	prostaglandin H syntázy	mikrozomy
	flavin-monooxygenázy	mikrozomy
	cytochromy P450	mikrozomy
<i>fáze II</i>		
<i>glukuronidace</i>	glukuronosyl transferázy	mikrozomy
<i>sulfatace</i>	sulfo transferázy	cytosol
<i>konjugace glutathionu</i>	glutathion-S transferázy	cytosol, mikrozomy
<i>konjugace aminokyselin</i>	acyl-KoA syntáza	mitochondrie, mikrozomy
<i>acylace</i>	acetyl transferázy	mitochondrie, cytosol
<i>methylace</i>	metyl transferázy	cytosol, mikrozomy, krev

2.2.2 První fáze

V první fázi, která se někdy nazývá také fází nesyntetickou se do molekuly biotransformované látky vnášejí nebo se v ní exponují funkční skupiny (–OH, –NH₂, –SH, –COOH), které jsou následně cílem pro biotransformaci ve druhé fázi. Přestože jsou tyto skupiny hydrofilní, obvykle nezpůsobí významné zvýšení hydrofility dané sloučeniny, tak aby již mohla být vyloučena. [1] [3]

2.2.2.1 Hydrolýza

Hydrolytické reakce biotransformačních procesů zahrnují zejména štěpení esterových vazeb za vzniku alkoholu a karboxylových kyselin, štěpení peptidových vazeb za vzniku oligopeptidů nebo aminokyselin a také štěpení epoxidových vazeb s tvorbou diolů. [6]

Karboxylesterázy, cholinesterázy a organofosfatázy

První ze dvou výše zmíněných enzymů katalyzují hydrolýzu esterů karboxylových kyselin, thioesterů a amidů. Karboxylesterázy jsou navíc schopné transesterifikace. Estery a anhydridy kyseliny fosforečné jsou hydrolyzovány organofosfatázami, které navíc hydrolyzují také aromatické estery karboxylových kyselin. [6]

Karboxylesterázy se nacházejí v mnoha tkáních a také v séru. Cholinesterázy se vyskytují v krvi a rozdělujeme je na acetylcholinesterázy lokalizované na membránách erytrocytů a pseudocholinesterázy vyskytující se v séru. [9]

Typické substráty pro tyto enzymy jsou například psychotropní látky jako heroin, kokain nebo látky užívané jako anestetika jako je prokain, sukcinylcholin nebo mivacurium. Relativně nepatrný rozdíl ve struktuře prokainu a prokainamidu způsobuje, že prokain jakožto ester karboxylové kyseliny je hydrolyzován relativně rychle, proto se v praxi užívá jako lokální anestetikum. Naproti tomu amidová vazba prokainamidu podléhá hydrolýze pomaleji, v systémové cirkulaci se tak prokainamid vyskytuje déle a indikuje se při léčbě srdeční

arytmie. Mechanismus působení těchto látek spočívá ve vazbě na napětově řízené sodíkové kanály, tím inhibují tok iontů nezbytný pro vznik a vedení impulsu. [6] [10]

Karboxylesterázy vedle aktivace lovastatinu, jehož následný metabolit inhibuje HMG-CoA reduktázu a tím pomáhá ke snížení hladiny cholesterolu, hydrolyzují a tím aktivují také CPT-11 (též Irinotecan), látku užívanou při léčbě kolorektálních karcinomů a karcinomů děložního čípku. Schopnosti karboxylesteráz aktivovat léčivé látky z jejich prekuzorů je možné klinicky využít. Jako příklad lze uvést aplikaci protilátky, která obsahuje jak antigen specificky se vážající na buňky tumoru tak právě i karboxylesterázu. Lék aplikovaný ve formě prekuzoru by následně byl místně cíleně aktivován a snížily by se tak jeho vedlejší nežádoucí účinky. [6] [9]

Významnou mutací v genu kódujícím pseudocholinesterázu je záměna sedmdesáté aminokyseliny v peptidovém řetězci z aspartátu na glycin. Sukcinylcholin jako jeden ze substrátů pro tento enzym způsobuje svalovou relaxaci. Asi 2 % kavkazské populace nesou zmíněnou mutaci, která způsobuje nižší vazebnou afinitu sukcinylcholinu k pseudocholinesteráze a prodlužuje tak jeho farmakologický efekt. Enzym katalyzuje hydrolýzu také acetylcholinu, prokainu, kokainu heroínu aj., na jejichž metabolismus ale zmíněná mutace nemá vliv. [11]

Epoxid hydrolázy

Substrátem pro tyto sloučeniny jsou alifatické i aromatické látky, které mají epoxidově vázaný kyslík. Reakcí se na daný epoxid aduje molekula vody a vznikají vicinální dioly s *trans* konfigurací. Epoxid hydrolázy se vyskytují ve všech tkáních. Existuje pět forem těchto enzymů, z nichž dvě tj. mikrosomální (mEH) a rozpustná epoxid hydroláza (sEH) detoxifikují exogenní látky a nejsou substrátově specifické, naproti tomu zbylé tři katalyzují hydrolýzu pouze endogenních substrátů, jak je zřejmé z jejich názvu, a vykazují vysokou substrátovou specifitu. Těmito jsou cholesterol epoxid hydroláza, leukotrien A₄ hydroláza a hepoxilin hydroláza. [6]

Substráty pro epoxid hydrolázy vznikají často činností cytochromu P450 jako produkty oxidace nenasycených sloučenin. Jako elektrofilní sloučeniny se mohou vázat na buněčné proteiny i DNA a poškozovat je. Proto se epoxid hydrolázy vyskytují společně s cytochromem P450 a je tak možné vzniklé reaktivní epoxidy záhy hydrolyzovat a zabránit tak jejich mutagennímu účinku. [8] [12]

Typickým substrátem pro epoxid hydrolázy jsou sloučeniny vznikající oxidací polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), mezi které se řadí i benzo(a)pyren. Tato látka vzniká při nedokonalém spalování, je součástí výfukových spalin, průmyslových spalin i cigaretového kouře. Vzniká také tepelnou úpravou masa – zejména při grilování a uzení. Benzo(a)pyren prochází v organismu oběma fázemi biotransformace. V první fázi se jeho metabolismu účastní zejména cytochromy P450 a epoxid hydrolázy za vzniku dihydrodiolů, arenoxidů, polyfenolů nebo chinonů. Ve druhé fázi jsou tyto produkty konjugovány s glutathionem, glukuronidem nebo sulfátem. Sled biotransformačních reakcí je zahájen oxidací cytochromem P450 nebo prostaglandin H syntázou na benzo(a)pyren-7,8-epoxid, který je následně hydrolyzován na benzo(a)pyren-7,8-diol. Tato látka může být cytochromy opět oxidována na řadu benzo(a)pyren-7,8-diol epoxidů, které jsou významnými mutageny. Vytvářejí adukty zejména s purinovými bázemi guanosinem a adenosinem. Testy

na myších, které byly exponovány benzo(a)pyrenu, prokázaly vznik mutací zejména v genech K-Ras, H-Ras a tumor supresorovém genu TP53. Vznik aduktů metabolitů benzo(a)pyrenu s DNA byl studován také na linii HeLa buněk. Ty vznikaly opět zejména na pozicích v genu TP53, kde dochází zároveň ke vzniku mutací specifických pro karcinomy plic. [6] [13]

Proteázy

Posledním typem enzymů jsou proteázy, enzymy štěpící peptidovou (amidovou) vazbu vázající jednotlivé aminokyseliny. Nacházejí se zejména v trávicím traktu, nicméně nezanedbatelná je jejich aktivita i v jiných tkáních a krvi. Podle místa štěpení rozlišujeme C a N terminální peptidázy a endopeptidázy. [6]

2.2.2.2 Redukce

Redukci po vstupu do organismu podléhají anorganické sloučeniny kovů i organické látky, je však těžké určit, zda dochází k redukci enzymatické, nebo neenzymaticky reakcí s glutathionem, FAD, FMN nebo NAD(P) kofaktory. Některé typy redukčních reakcí jsou zprostředkovávány také střevní mikroflórou. Níže jsou rozvedeny některé typy redukčních reakcí, které se účastní metabolismu důležitých léčiv nebo se účastní metabolismu látek způsobujících oxidační stres. [1] [6]

Azo a nitro redukce

Redukce těchto sloučenin probíhá pomocí bakterií nacházejících se ve střevech, kde jsou díky nízké koncentraci kyslíku ideální podmínky. K redukci enzymatické není třeba speciálních reductáz, reakce jsou katalyzovány cytochromem P450 a NAD(P)H-chinon oxidoreduktázou. Za určitých podmínek je redukci schopna uskutečnit i aldehyd oxidáza – ke své činnosti vyžaduje jako kofaktor NAD(P)H a limitující koncentraci kyslíku. [6]

Redukce karbonylových sloučenin

Redukce aldehydů a ketonů na primární a sekundární alkoholy je zprostředkována alkoholdehydrogenázou a velkou skupinou enzymů rodiny karbonyl reductáz. Karbonyl reductázy jsou monomerní enzymy vyžadující pro svou funkci NAD(P)H. Jsou přítomny především v krvi a játrech, ale také v ledvinách, mozku a ostatních tkáních. Substrátem pro karbonyl reductázy jsou mnohá léčiva, jako například acetoexamid (perorální antidiabetikum), daunorubicin (chemoterapeutikum) nebo warfarin (antikoagulans). [6]

Redukce chinonů

Redukce chinonových sloučenin je zprostředkována třemi odlišnými enzymovými aparáty. První z nich využívá flavoproteinového enzymu NAD(P)H-chinon reductázy (DT-diaphorázy) a přenosem dvou elektronů z molekuly NAD(P)H na substrát vytváří stabilní hydrochinonové sloučeniny. Druhým typem redukce je zejména u člověka redukce pomocí karbonyl reductáz. Třetím typem enzymů jsou NADPH-cytochrom P450 reductázy. Tímto redukčním mechanismem však na rozdíl od prvních dvou vznikají volné semichinonové radikály, které podléhají autooxidaci a vedou k nestechiometrické oxidaci NADPH a spotřebě kyslíku. Dochází k tvorbě superoxidů, hydroperoxidů a jiných reaktivních kyslíkových sloučenin, které poškozují buněčné struktury. Toxicita chinonů a látek, které na ně mohou být metabolizovány, tedy spočívá právě ve zvyšování oxidačního stresu. [6] [14]

Dehalogenace

Jako u redukce chinonů, i dehalogenační reakce mohou probíhat třemi mechanismy. Prvním typem odstranění halogenu z molekuly alifatického uhlovodíku je redukční dehalogenace, při které je atom halogenu nahrazen atomem vodíku. Dalším typem je oxidační dehalogenace, halogen je tedy nahrazen kyslíkovým atomem a posledním mechanismem je eliminace dvou sousedních halogenů za vzniku dvojné vazby tzv. dehydrohalogenace. První dva mechanismy jsou katalyzovány cytochromy P450, dehydrohalogenace pak také cytochromem P450 nebo glutathion S-transferázami. Substráty pro tyto enzymy jsou halogenované alkany. Ty podléhají jednoelektronové redukční dehalogenaci a dochází tak k tvorbě radikálů uhlíku, které mohou iniciovat peroxidaci buněčných lipidů. [6]

Další reakce a enzymy redukčních reakcí

Dalšími redukčními systémy první fáze biotransformace xenobiotik jsou redukce disulfidů pomocí glutathionu za vzniku thiolových sloučenin. Dále je to redukce sulfoxidů a *N*-oxidů zprostředkovaná thioredoxin-dependentními enzymy respektive flavin monooxygenázami a cytochromem P450. Dihydropyrimidin dehydrogenázy (DPD) se významně účastní metabolismu bázi thyminu, uracilu a také 5-fluorouracilu, léku používaného jako chemoterapeutika. Současné studie uvádějí částečnou deficienci pro DPD u 8 % populace. Nedostatečná aktivita tohoto enzymu vede k pomalému odbourání 5-fluorouracilu a tím ke značnému zvýšení jeho toxicity. Přesto se u pacientů, jimž je navržena léčba 5-fluorouracilem, vyšetření deficiencie DPD neprovádí. [6] [15]

2.2.2.3 Oxidace

Oxidace jsou nejčastějšími reakcemi v první fázi metabolismu xenobiotik. Většina z nich je zprostředkována velkou skupinou enzymů zvaných cytochromy P450, které jsou společně s alkoholy a aldehydy dehydrogenázami popsány v textu níže. Dalšími enzymy, které katalyzují oxidační reakce, jsou flavinmonooxygenázy oxidující heteroatomy dusíku, síry nebo fosforu v molekulách amfetaminů, metamfetaminů nebo tamoxifenu a peroxidázy, které k oxidaci substrátu nevyžadují kofaktory NADP ani NADPH ale využívají tzv. kooxidace při redukcí peroxidů vodíku a lipidických hydroperoxidů. [3] [6]

Cytochrom P450

Enzymový aparát cytochromu P450 se účastní metabolismu široké škály xenobiotik i některých endogenních substrátů. Podílí se na tvorbě cholesterolu, steroidů, žlučových kyselin, eikosanoidů a metabolismu nenasycených mastných kyselin. Dodnes bylo popsáno více než 3 000 různých cytochromů P450 vyskytujících se jak v živočišné, tak rostlinné říši. Katalyzují desítky typů reakcí, nejdůležitější z nich je však hydroxylace. Původně byly popsány jako pigmenty, odkud pramení také jejich název. Druhá část názvu vychází z toho, že redukovaná forma enzymu váže molekulu oxidu uhelnatého a v tomto stavu vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 450 nm. [4]

Strukturně se jedná o protein nesoucí ve své sktruktuře molekulu hemu. Centrálním atomem je železo s koordinačním číslem 6. Čtyřmi vazbami je železo vázáno k molekule hemu. Pátá vazba spojuje hem s proteinem přes thiolovou skupinu cysteinu (na rozdíl od

hemoglobinu, který je spojen přes histidin) a šestým ligandem je pak v průběhu oxidačních reakcí kyslík. [3]

Cytochrom P450 se nachází ve většině tkání těla, nejvyšší koncentrace cytochromu P450 je v játrech, menší pak v tenkém střevě. V buňkách tkání je lokalizován zejména na membráně endoplazmatického retikula, mitochondrií a jádra. Množství enzymu v tkáních však není konstantní a vlivem vnějších i vnitřních faktorů se může jeho koncentrace lišit. Mezi jejich charakteristické vlastnosti patří indukovatelnost, široká substrátová specifita a genový polymorfismus. [4] [6]

Pro metabolismus xenobiotik je důležitá monooxygenázová aktivita cytochromu P450. Mechanismus oxidace substrátu je následující: substrát je navázán na oxidovanou formu cytochromu (Fe^{3+}), následně dojde k redukci železitého iontu na železnatý, což umožní vazbu molekuly kyslíku za vzniku ternárního komplexu. Jeden z atomů molekuly kyslíku je zabudován do molekuly substrátu a druhý přijímá vodíkové protony a vzniká molekula vody. Redukční ekvivalenty k reakcím jsou získány z molekuly NAD(P)H, nejsou však cytochromem P450 přijímány přímo. Děje se tak prostřednictvím flavoproteinu NAD(P)H-cytochrom P450 reduktázy nebo ferredoxinu a ferredoxin reduktázy. Poslední dva zmíněné proteiny přenášející elektrony na cytochrom P450 jsou lokalizovány v mitochondriích a podílejí se také na syntéze steroidních hormonů a metabolismu vitamínu D. [6]

Cytochromy P450 jsou velice početnou skupinou enzymů. Společně tvoří tzv. superrodinu, která je označována zkratkou CYP. Cytochromy P450 vykazující alespoň 40% podobnost jsou společně zařazeny do rodin označovaných číslem, členové podrodiny pak vykazují minimálně 55% podobnost a jsou označeny písmeny. U člověka bylo popsáno přibližně 70 funkčních izoforem tohoto enzymu, přičemž rodiny CYP1, CYP2 a CYP3 kódují drtivou většinu enzymů účastnících se metabolismu xenobiotik. [4]

Alkohol dehydrogenázy

Enzym alkohol dehydrogenáza se skládá ze dvou proteinových podjednotek a atomu zinku. Podjednotek je šest typů, označují se řeckými písmeny a každá z nich je kódovaná svým genem. Podjednotky α , β a γ mohou tvořit mezi sebou tvořit libovolné heterodimery, zatímco zbylé podjednotky se skládají pouze jako homodimery. Podle podjednotkového složení jsou pak alkoholdehydrogenázy rozděleny do čtyř tříd. Izoenzymy třídy I katalyzují oxidaci etanolu, metanolu a jiných nižších alifatických alkoholů na odpovídající aldehydy nebo ketony. Hojně jsou exprimovány v játrech, méně pak v ledvinách či plicích. Enzymy třídy III oxidují pentanol nebo vyšší alifatické alkoholy a aromatické alkoholy. Vyskytují se prakticky ve všech tkáních včetně mozku. Alkohol dehydrogenázy třídy IV oxidují retinol. Jsou exprimovány v gastrointestinálním traktu, v játrech exprimovány nejsou. [6]

Aldehyd dehydrogenázy

Substrátem pro tyto enzymy jsou aldehydy, produktem karboxylové kyseliny. Jako kofaktor reakce slouží NAD^+ . Jedná se o velmi heterogenní skupinu enzymů, bylo identifikováno celkem 12 genů kódujících aldehyd dehydrogenázy. Liší se primární strukturou proteinu, místem exprese i substrátovou specifitou. Acetaldehyd je hlavním substrátem pro ALDH2. V genu pro ALDH2 byl identifikován polymorfismus. Jedná se o bodovou mutaci měnící aminokyselinu na 487. pozici z glutamátu na lysin, která má za

následek sníženou aktivitu tohoto enzymu. Vyskytuje se zejména v asijské populaci s frekvencí 45-53 %, kde je také vysoký výskyt polymorfismu v genu pro alkoholdehydrogenázu, která způsobuje naopak zrychlenou konverzi etanolu na acetaldehyd. Kombinací těchto dvou mutací tak dochází k rychlé tvorbě acetaldehydu a pomalé konverzi acetaldehydu na kyselinu octovou. Frekvence výše zmíněných potažmo dalších méně častých polymorfismů tak determinuje rozdíly v toxicitě a následcích konzumace alkoholu v jednotlivých populacích. Inhibice ALDH se využívá také klinicky při léčbě alkoholismu. U závislého jedince dochází po podání léku k akumulaci acetaldehydu, který způsobuje nevolnost a zvracení. Mimo to je ale také acetaldehyd schopen vytvářet adukty s proteiny a nukleovými kyselinami a tím je poškozovat. [6] [16]

2.2.3 Druhá fáze

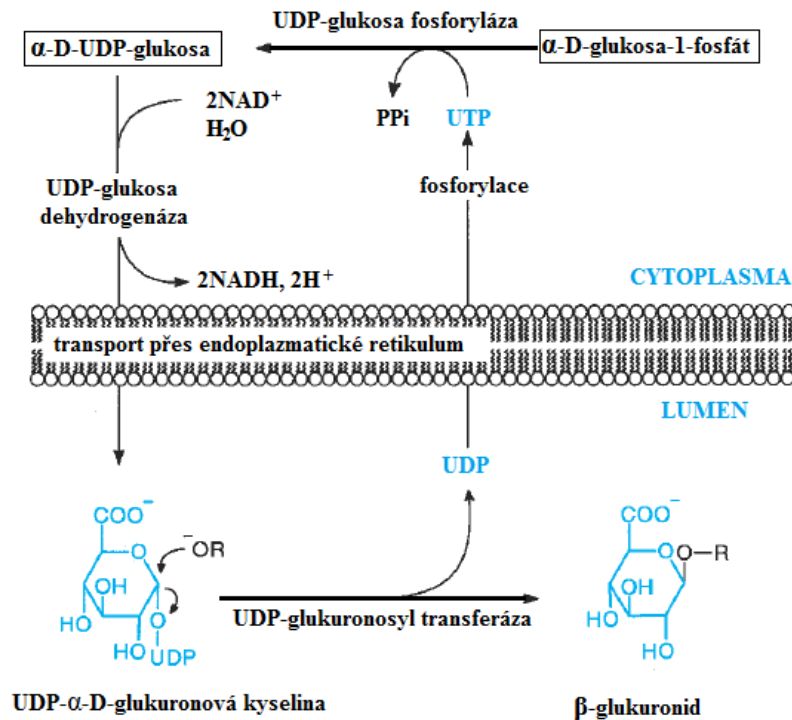
Druhá fáze metabolismu xenobiotik zahrnuje zejména důležité konjugační reakce. Ty vyžadují substrát s vhodnou skupinou, na který může být konjugovaná látka připojena a transferázy přenášejí konjugační činidla. Konjugací vzniká látka, která vykazuje vyšší rozpustnost ve vodě a může být snadno vyloučena z organismu. Častým substrátem pro konjugační reakce jsou i endogenní substráty například bilirubin. Konjugačními činidly jsou kyselina glukuronová, sulfát, acetát, glutathion, metyl a některé aminokyseliny. Všechny reakce druhé fáze metabolismu xenobiotik spotřebovávají energii ve formě ATP buď k vlastní konjugaci, nebo k aktivaci molekul konjugovaných na substrát. Přenos fosfátu přímo na substrát by spotřebovával méně energie a zároveň by došlo ke zvýšení hydrofilicity substrátu. Tato reakce se však v procesu metabolismu xenobiotik vůbec nevyskytuje. Vysvětlení jsou následující: pokud by byla koncentrace xenobiotik ve tkáni vysoká, byla by vysoká i spotřeba fosfátů pro jejich konjugaci, což by mohlo ohrozit energetický metabolismus buňky. Dalším důvodem je fakt, že přes membránu buněk nepřechází nabitě molekuly a membrána nemá přenašeče pro fosforylované látky, což umožňuje buňkám udržet fosforylované substráty (např. glukóza-6-fosfát) uvnitř. Některé fosforylované molekuly slouží zároveň jako signální molekuly. Pokud by byly fosforylovány i xenobiotika, mohly by signální dráhy ovlivňovat, což je poslední z teorií, která vysvětluje evidentní selekční tlak vůči mechanismům, které by umožňovaly fosforylaci xenobiotik. [3] [6]

2.2.3.1 Glukurodinace

Glukuronidace je hlavní cestou metabolizace xenobiotik a některých endogenních látek v organismu většiny savců. Tento metabolický krok vyžaduje jako kofaktor uridindifosfát (UDP) glukuronovou kyselinu. Reakce navázání glukuronové kyseliny na substrát je katalyzována enzymem UDP-glukuronosyl transferázou, která se nachází v endoplazmatickém retikulu zejména hepatocytů, ale i buněk dalších tkání (ledvin, střev, kůže, mozku nebo nosních sliznic). [6]

Syntéza UDP-glukuronové kyseliny probíhá v cytosolu nejprve reakcí glukosa-1-fosfátu s uridintrifosfátem za vzniku α -D-UDP glukosy. Následuje oxidace uhlíku v poloze šest na karboxyl. UDP-glukuronová kyselina je hydrofilní látkou, pro její transport přes membránu endoplazmatického retikula je proto použito přenašeče. Tento přenašeč také odvádí UDP vzniklý při samotné glukuronidaci xenobiotik zpět do cytoplasmy. [17]

Vazba UDP na glukosu je v poloze alfa, UDP-glukuronová kyselina tak není substrátem pro β -glukuronidázu a je tak chráněna proti hydrolyze. Glukuronidy xenobiotik a endogenních substrátů zaujímají polohu beta. β -glukuronidáza se vyskytuje v lysozomech některých savčích buněk, významnější aktivitu však má ta, kterou produkují bakterie střevní mikroflóry. Tato β -glukuronidáza hydrolyzuje vazbu glukuronidu a látka, jež měla být z těla vyloučena, může být enterohepatálním oběhem opět reabsorbována. Syntézu UDP glukuronové kyseliny, její lokalizaci a inverzi konfigurace znázorňuje na obrázek 3. [6]



Obrázek 3 - Syntéza UDP glukuronové kyseliny [6]

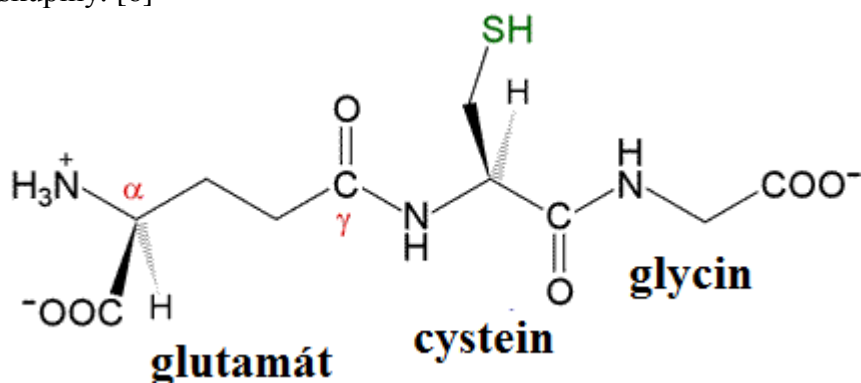
Vazba glukuronové kyseliny na substrát probíhá v endoplazmatickém retikulu. Na substrát je navázána v místě s vyšší elektronovou hustotou, nejčastěji na heteroatom kyslíku, síry nebo dusíku (nukleofilní atom). Podle funkčních skupin, které substráty obsahují, vznikají následující produkty glukuronidace:

- alkoholy, fenoly \rightarrow *O*-glukuronid ethery
- karboxylové kyseliny \rightarrow *O*-glukuronid estery
- primární a sekundární aminy \rightarrow *N*-glukuronidy
- terciární aminy \rightarrow kvartérní glukuronidy
- thioly \rightarrow *S*-glukuronidy

Navázání glukuronové kyseliny je však možné i na dostatečně nukleofilní uhlíkový atom a reakcí pak vznikají *C*-glukuronidy. Takovýto atom uhlíku se zvýšenou elektronovou hustotou obsahují například látky fenylobutazon a sulfinpyrazon (farmaka) nebo rostlinný toxin kumarin nesoucí ve své struktuře karbonylový uhlík. Více se glukuronidaci věnuje kapitola 2.3.1 Mutace DNA. [6] [17]

2.2.3.2 Konjugace glutathionu

Glutathion je tripeptid složený z glycinu, cysteinu a glutamové kyseliny. Jak je vidět z obrázku 4, glutamová kyselina je spojena peptidovou vazbou s cysteinem prostřednictvím γ -karboxylové skupiny. [6]



Obrázek 4 - Struktura molekuly glutathionu [18]

Při konjugaci glutathionu vzniká na rozdíl od konjugace s jinými aminokyselinami thioetherová vazba. Mechanismus reakce spočívá v ataku nukleofilního atomu síry obsažené v cysteinu na elektrofilní atom uhlíku v molekule substrátu. Glutathion může být ale také konjugován na sloučeniny obsahující heteroatomy kyslíku, dusíku nebo síry. [3] [18]

Syntéza samotného glutathionu je zahájena tvorbou peptidové vazby mezi cysteinem a kyselinou glutamovou za katalýzy γ -glutamylcystein syntázou. Následně je glutathion syntázou ke glutamové kyselině navázán glycin. Obě reakce spotřebovávají energii z hydrolyzy ATP. Konjugace glutathionu k substrátu je katalyzována glutathion S-transferázami. Tyto enzymy se vyskytují zejména v játrech, střevech, ledvinách, plicích a varlatech (95 % je lokalizováno v cytoplazmě, zbylých 5 % v endoplazmatickém retikulu). Xenobiotika, která jsou určena ke konjugaci s glutathionem, vykazují tři základní vlastnosti: hydrofobicitu, přítomnost elektrofilního atomu a v malé míře jsou také schopny konjugovat glutathion i neenzymaticky. Neenzymatické konjugace jsou typické pro jaterní tkáň, kde je vysoká koncentrace glutathionu (10 mM). Vysoká je ve tkáních i koncentrace samotných glutathion transferáz, které mohou tvořit až 10 % celkových proteinů obsažených v buňce. Konjugáty xenobiotik s glutathionem mohou být záhy vyloučeny žlučí nebo ještě podléhat konverzi na merkaptany. Tvorba merkaptanů je situována v ledvinách a takto metabolizovaná xenobiotika jsou vyloučena močí. Reakce vedoucí k merkaptanům spočívají v enzymatickém odštěpení glycinu a glutamátu a následné N-acetylaci cysteinového zbytku. [6]

Významnou roli hrají glutathion S-transferázy při vylučování kancerogenních látek. Podílejí se na eliminaci epoxidů a radikálů nejrůznějších struktur, které by mohly poškozovat DNA či jiné buněčné struktury. Více se glutathion transferázám věnuje kapitola 2.6 Glutathion S-transferázy. [19]

2.2.3.3 Sulfatace

Přestože u této konjugační reakce dochází k přenosu sulfonátové skupiny (SO_3^-), v textu bude dále používán v literatuře zavedený termín sulfát, sulfátová skupina. Konjugací sulfátu k substrátu vznikají vysoce hydrofilní sulfátové estery, které jsou vylučovány nejčastěji močí. Při jejich vyloučení do žluči může díky přítomnosti aryl sulfatáz produkovaných střevní

mikroflórou docházet k hydrolýze esterové vazby a následné enterohepatální cirkulaci xenobiotika. Reakce je katalyzována sulfo transferázami, které se nacházejí v cytosolu buněk jater, ledvin, mozku, trávicího traktu a plic a v menší míře také v jiných tkáních. Enzym pracuje s kofaktorem 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátem (PAPS), který vzniká aktivací sulfátu. Nejčastějšími substráty jsou alifatické alkoholy a fenolické sloučeniny, sulfát však lze přenést také na některé aromatické aminy nebo N-hydroxy sloučeniny. Karboxylové kyseliny substrátem pro sulfatázy nejsou, ale mnoho z nich působí jako jejich kompetitivní inhibitory. Mechanismus reakce u všech substrátů spočívá v nukleofilním útoku kyslíkové nebo dusíkové skupiny na elektrofilní atom síry v PAPS. Mnoho substrátů jako chloramfenikol, ethinylestradiol, dopamin, naftol nebo anilin podléhají sulfatačním reakcím přímo, další velká skupina substrátů je v první fázi metabolismu nejprve hydroxylována a následně podléhá sulfataci. Sulfo transferázy nejsou indukovatelné xenobiotiky. Relativně nízký podíl sulfatačních reakcí na celkové metabolizaci xenobiotik je způsoben pravděpodobně nízkou koncentrací volného cysteinu, ze kterého se oxidačními reakcemi vytváří sulfát pro syntézu PAPS. Nízká koncentrace PAPS má pak za následek nízkou kapacitu této konjugační reakce, přestože afinita enzymu k substrátu je vyšší než například u UDP-glukuronosyl transferáz. [4] [6]

Sulfotransferázy (zkráceně SULT) jsou rozděleny do jednotlivých rodin, ve kterých enzymy sdílejí minimálně 40% shodnost aminokyselinové sekvence. Z celkových pěti objevených SULT rodin se u člověka vyskytují dvě: SULT1 a SULT2, do kterých je zároveň zařazena většina dosud objevených sulfotransferáz všech živých organismů. Rozdílná je substrátová specifita těchto dvou rodin, SULT1 katalyzují sulfataci fenolů, katecholů a aromatických steroidů, zatímco SULT2 sulfataci primárních i sekundárních alkoholů, žlučových kyselin a hydroxysteroidů. [4]

2.2.3.4 Acetylace

Acetylace je hlavní metabolickou cestou biotransformace aromatických aminů a hydrazinových sloučenin. Alifatické aminy jsou pouze výjimečně substráty pro acetylační reakce. N-acetylace je katalyzována N-acetyl transferázami (NAT), kterým jako kofaktor slouží acetyl-koenzym A z intermediálního metabolismu. Přenos acetylu na molekulu substrátu probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku je acetyl z molekuly kofaktoru navázán na cysteinový zbytek v aktivním centru enzymu. Ve druhém kroku je acetyl z molekuly enzymu navázán na aminoskupinu substrátu, enzym je regenerován. Pro silně bazické aminy je rychlost limitující první krok, pro slabě bazické aminy krok druhý. [4] [6]

U člověka byly identifikovány dvě formy N-acetyltransferáz, jsou označovány jako NAT1 a NAT2. Tyto dvě formy enzymu sdílejí 87% podobnost aminokyselinové sekvence, jejíž délka je 290 aminokyselin. Geny pro oba tyto enzymy jsou bezintronové a leží na chromosomu 8. Každý ale podléhá vlastní regulaci. NAT1 je exprimován ve většině tkání, zatímco NAT2 především ve střevech a v játrech. Jejich substrátové specifity se překrývají. Kancerogenní látky jako jsou aromatické aminy nebo 2-aminofluoren jsou acetylovány oběma enzymy stejně. Neacetylované aromatické aminy mohou podléhat reakcím s cytochromem P450, prostaglandin H syntázou nebo UDP-glukuronosyl transferázou a měnit se tak v produkty schopné vázat a poškozovat DNA. K aktivaci aromatických aminů N-acetyltransferázami dochází pouze v případě předchozí hydroxylace cytochromem P450.

NAT pak reagují se vzniklými hydroxylaminy za vzniku acetoxy esterů. Molekula acetoxy esterů N-hydroxylaminů se rozpadá na vysoce reaktivní karboniový kation vázající se na DNA. [4] [6]

Genový polymorfismus N-acetyl transferáz je velký. Obecně se všechny nalezené varianty genu rozdělily podle fenotypu na pomalé a rychlé acetylátory. V kavkazské populaci se vyskytuje až 60 % jedinců spadajících mezi pomalé acetylátory. Polymorfismus NAT2 je diskutován v souvislosti se vznikem nádorů kolonu a močového měchýře indukovaných aromatickými aminy. Nádory kolonu jsou asociovány s heterocyklickými aromatickými aminy, které vznikají pyrolýzou aminokyselin (bílkoviny upravené za vysoké teploty). Ty nejsou dobrým substrátem pro NAT2 ani NAT1 a podléhají tak nejprve hydroxylaci ze strany cytochromu P450. Přítomnost genu pro aktivnější NAT1 či NAT2 nezvyšuje eliminaci samotných aromatických aminů. Naopak urychlí až následující krok, při kterém z N-hydroxylaminů vznikají reaktivní sloučeniny poškozující buněčné struktury. Rychlí acetylátoři jsou tak ve vztahu k metabolismu aromatických aminů v nevýhodě. [4]

2.2.3.5 Metylace

Metylace na rozdíl od ostatních reakcí druhé fáze biotransformace snižuje hydrofilitu substrátu a chrání funkční skupiny, které by mohly podléhat konjugaci. Výjimku však tvoří metylace atomu dusíku za vzniku kvartérních amoniových solí. Ty jsou dobře rozpustné ve vodě a mohou být snadno vyloučeny. Příkladem takové reakce je metylace dusíku v molekule heterocyklické molekuly nikotinu. [6]

Kofaktor metylačních enzymů je S-adenosylmethionin (SAM). Metylová skupina v této molekule snadno podléhá nukleofilnímu ataku sloučenin obsahujících síru, dusík nebo kyslík. Substráty pro tyto reakce tvoří zejména fenoly, katecholy, alifatické i aromatické aminy, N-heterocykly a sulfhydrylové sloučeniny. Reakce probíhají nejčastěji v cytosolu hepatocytů a nervových buněk. Metylační reakce jsou důležité zejména pro metabolismus endogenních sloučenin. Dodnes byly identifikovány stovky různých metylačních enzymů. Substráty pro tyto enzymy mohou být malé molekuly hormonů, léčiv, drog nebo jiných xenobiotik, ale také proteiny, molekuly RNA i DNA. V kontextu metabolismu xenobiotik je třeba zmínit zejména tyto enzymy: katechol-O-metyl transferáza, histamin-N-metyltransferáza, fenol-O-metyltransferáza a thiopurin-metyl transferáza. [4] [6]

Gen pro thiopurin-metyl transferázu vykazuje polymorfismus. V kavkazské populaci se výskyt mutací, které nositele předurčují k nižší aktivitě tohoto enzymu, pohybuje kolem 1 %. Enzym exprimovaný podle mutovaného genu vykazuje až 400x sníženou aktivitu oproti nemutovaným jedincům. Tito jedinci spolu s 9 % jedinců, kteří vykazují střední aktivitu thiopurin-metyl transferázy, jsou ohroženi intoxikací léky na bázi thiopurinu. Ty jsou užívány při autoimunitních onemocněních, jako imunosupresiva po transplantacích nebo u choroby zvané myasthenia gravis. Před užíváním léků na bázi thiopurinu je tak indikováno genetické vyšetření polymorfismu tohoto genu. [4] [20]

2.2.3.6 Konjugace aminokyselin

Konjugace aminokyselin může proběhnout dvěma způsoby. První možností je vazba amino skupiny aminokyseliny na karboxylovou skupinu xenobiotika. Prvně je na molekulu xenobiotika navázán koenzym A. Vzniklý acyl-KoA reaguje s amino skupinou za vzniku amidové vazby. Touto cestou jsou na substrát konjugovány aminokyseliny glycin, glutamin

nebo taurin. Druhou možností pak obráceně navázání karboxylového konce aminokyseliny na N-hydroxy amin xenobiotika. Tato dráha vyžaduje aktivaci aminokyseliny aminoacyl-t-RNA-syntetázou. Ta reaguje s xenobiotikem za vzniku reaktivních N-esterových sloučenin. Takto konjugovanými aminokyselinami jsou serin a prolin. Substráty pro konjugaci jsou pouze některé alifatické, aromatické a heterocyklické kyseliny spolu s kyselinou skořicovou a jejími deriváty. Schopnost konjugace aminokyselin závisí na charakteru substituentů na aromatickém kruhu, alifatickém řetězci nebo v blízkosti karboxylové skupiny. Příkladem substrátu pro konjugaci může být fenylactová kyselina (kyselina difenyl octová kvůli sterickému bránění konjugaci podléhat nemůže). [3] [6]

2.3 Kancerogeneze

Kancerogeneze zahrnuje proces přeměny normální buňky v buňku nádorovou. Jedná se o postupný proces hromadění chyb v regulačních mechanismech buňky. Tři hlavní mechanismy, které vedou k této transformaci, jsou poruchy buněčného dělení, diferenciace a programované buněčné smrti – apoptózy. Všechny buňky nádoru vznikly podle monoklonální teorie z jedné mutované buňky, která získala výhodu oproti ostatním buňkám a začala se nekontrolovaně dělit. Nádor je pak souborem buněk, které jsou klony této tzv. prvotně iniciované buňky. Buňky, kterým byly alespoň částečně zanechány vlastnosti původních buněk a setrvávají na místě, tvoří benigní nádory. Maligní tumory jsou tvořeny buňkami, které se od normálních buněk liší ve více faktorech a především získaly schopnost pronikat do okolních tkání a zakládat metastázy. [21]

Riziko vzniku nádorů je individuální. Závisí na genetických faktorech jedince a také na životním prostředí, ve kterém jedinec žije. Z charakteru transformace normální buňky v buňku nádorovou je zřejmé, že významnou roli v procesu kancerogeneze hraje čas. Čím delší je život jedince, tím dochází ke zvýšení počtu změn v DNA a roste pravděpodobnost vzniku nádoru. S věkem také zároveň klesá účinnost reparačních mechanismů. [22]

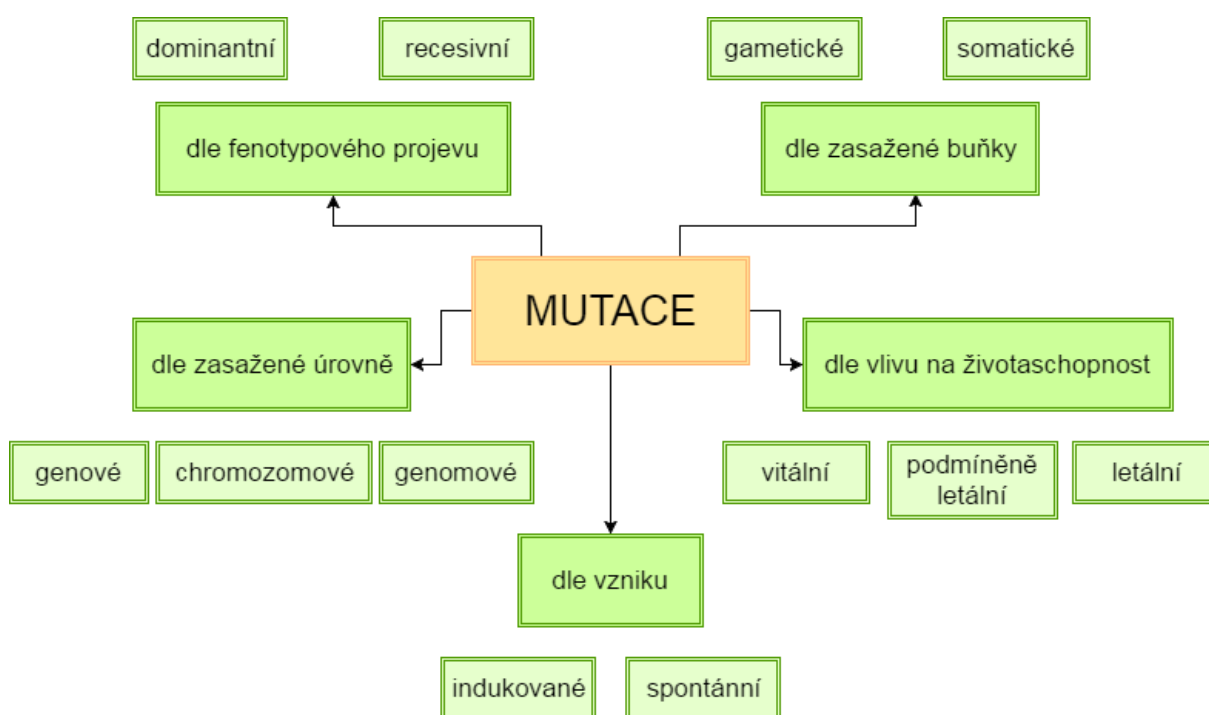
Proces maligní transformace buňky lze rozdělit do několika charakteristických částí:

- 1. Iniciační stádium** zahrnuje primární genetickou událost, kterou je mutace kritického genu. Jedná se o nevratnou změnu, která buňce přináší selekční růstovou výhodu. Buňka sice získává maligní potenciál, ale proces se v této fázi může zastavit.
- 2. Promoční stádium** může trvat roky i desítky let. Zatím je předmětem mnoha studií, toto stádium není ještě dostatečně objasněno. Iniciovaná buňka je vlivem promočních faktorů stimulována k dalšímu růstu a proliferaci. Promoční faktory jako takové nemají kancerogenní vlastnosti a nejsou schopny vyvolat tvorbu nádoru. Čím vyšší je intenzita promočních faktorů působících na iniciovanou buňku, tím vyšší je pravděpodobnost posunu buňky do fáze progresu. Naopak odstranění těchto faktorů může zpomalit nebo až zabránit vývoji malignity. Mezi hlavní promoční faktory se dle současných studií řadí nemutagenní látky cigaretového kouře, nadměrná konzumace tuků, alkohol a některé hormony.
- 3. Stádium progresu** je charakteristické kumulací dalších změn v regulačních mechanismech buňky. Dochází k trvalé aktivaci růstových stimulů, buňka se nekontrolovaně dělí a ztrácí schopnost apoptózy a kontaktní inhibice. Jsou aktivovány faktory umožňující šíření

nádorových buněk do svého okolí i vzdálených tkání, tvoří se metastázy. Dochází také k tzv. neoangiogenezi čili tvorbě cév zásobujících nádorové buňky živinami a kyslíkem. [23]

2.3.1 Mutace DNA

Mutace je nevratná změna na úrovni sekvence DNA v genomu buňky. Obecné dělení mutací znázorňuje schéma na obrázku 5. Dle typu zasažených buněk rozdělujeme mutace na somatické a gametické. Obojí mohou vznikat spontánně nebo mohou být indukované vlivy vnějšího prostředí. Somatické mutace vznikají v jednotlivých buňkách organismu a nejsou přenášeny na potomky. Jsou příčinou tzv. sporadických nádorů, kterými se tato práce zabývá. Mutace gametické vznikají v zárodečných buňkách a jsou tedy přítomny v každé buňce jedince. Jsou spojeny s dědičnými nádorovými onemocněními (nádorovými syndromy). [21] [24]



Obrázek 5 - Přehled mutací dle jejich vzniku [25]

Pokud dojde ke vzniku mutace, která ovlivní některé důležité mechanismy, buňka je schopna transformace v maligní buňku. Primární příčinou vzniku nádorů jsou mutace ve třech typech genů (viz níže).

Mutace tumor supresorových genů jsou recesivního charakteru, k manifestaci projevu je třeba, aby byly poškozeny obě alely těchto genů. Produktem tumor supresorových genů jsou proteiny potlačující dělení nebo podporující diferenciaci a apoptózu. Mutací je poškozena funkce těchto proteinů nebo k jeho tvorbě vůbec nedochází. Příkladem těchto genů jsou BRCA1, BRCA2 nebo Rb-protein. U hereditárních nádorových syndromů je ve všech buňkách těla jedna mutovaná alela zděděná a stačí, aby došlo k somatické mutaci alely druhé a buňka tak získá nádorový potenciál. Tento proces je nazýván jako ztráta heterozygoty (LOH z anglického loss of heterozygosity).

Mutace protoonkogenů jsou dominantního charakteru. Produktem protoonkogenů je protein podporující buněčné dělení a potlačující diferenciaci. Mutace protoonkogenů na onkogen vede k expresi nadměrného množství tohoto onkoproteinu nebo k jeho hyperaktivní formě. Buňka je pak neustále stimulována k dělení. Významnými protoonkogeny, jejichž mutovaná forma se vyskytuje až u 50 % všech maligních onemocnění jsou geny rodiny ras.

Mutace genů reparujících poškozenou DNA jsou recesivní. Celkem se na reparaci poškozené DNA podílí produkty asi 100 genů, které vykazují vysokou konzervativnost. Na rozdíl od mutací předchozích, mutace reparačních genů neposkytují buňkám tumoru žádnou výhodu. Vliv těchto mutací se manifestuje později (nepřímo) tím, že nejsou opravovány chyby vzniklé v tumor supresorových genech a onkogenech. Ztráta funkce proteinů reparujících DNA zvyšuje četnost mutací až o tři řády. Příkladem jsou geny, které kódují proteiny zajišťující excizní reparaci poškozené DNA. [21] [23]

Jak již bylo zmíněno výše, k iniciaci kancerogeneze nestačí jediná chyba, je to proces vícestupňový. Je prokázáno, že k rozvoji nádorového onemocnění je potřeba 6-12 mutací různých onkogenů. Funkce zmíněných genů může být zároveň ovlivněna také faktory epigenetickými (metylací DNA, acetylací histonů). Byl publikován seznam celkem 291 genů, jejichž změny hrají zásadní roli při procesu kancerogeneze. U 90 % těchto genů byly detekovány zejména somatické mutace, u 20 % se jedná o zárodečné mutace a u 10 % genů se jedná o kombinace somatických a zárodečných mutací. Kumulace somatických mutací je způsobena genotoxickými vlivy fyzikálního, chemického nebo biologického charakteru, které jsou blíže popsány níže. [26]

2.3.1.1 Spontánní mutace

Spontánní mutace vznikají jako náhodné chyby při replikaci DNA například v důsledku existence tautomerních forem bází. Tymin je schopen ve své vzácné enolové formě tvořit tři vodíkové můstky a párovat se tak s guaninem. Imino forma adeninu je pak schopna párování s cytosinem. Doba existence těchto vzácných tautomerních forem adeninu i thyminu je však krátká (10^{-5} až 10^{-4}). Dalším důvodem chybného párování bází může být jejich deaminace nebo zařazení uracilu namísto tyminu. DNA polymeráza je ale přesný enzym, který má navíc schopnost autokorekce – umí špatně začleněné báze odstranit a nahradit správnými. Frekvence takto způsobených mutací je proto nízká, uvádí se zhruba 10^{-6} až 10^{-9} na buňku za jednu generaci. [24] [25]

2.3.1.2 Indukované mutace

Mezi indukované mutace řadíme ty, které jsou způsobeny mutagenními faktory vnějšího prostředí. Rozdělují se do skupin na fyzikální, chemické a biologické mutageny. Výstupem všech těchto tří faktorů může být také zvýšení oxidačního stresu vedoucího rovněž k tvorbě mutací. [24]

Fyzikální mutageny

Nejběžnějším fyzikálním mutagenem, kterému je organismus vystaven, je UV záření. Jeho hlavním zdrojem je Slunce a před jeho nadměrným dopadem na povrch Země jsme chráněni ozonovou vrstvou. Ta se ale prokazatelně ztenčuje, její protektivní účinek tak klesá.

UV záření nemá schopnost pronikat tkáněmi, poškozují proto pouze povrchové buňky těla – je jednou z hlavních příčin vzniku melanomů. Princip mutagenity spočívá v absorpci záření různými organickými látkami. Ty jsou zářením excitovány a reagují s kyslíkem za vzniku volných radikálů (singletového kyslíku, superoxidů apod.). Reaktivní kyslíkové radikály reagují s kolagenem a jinými bílkovinami kůže a degradují je, což je principem stárnutí kůže popř. vzniku melanomů. UV záření vytváří také hydráty purinových bází a dimery pyrimidinů (zejména thyminu). Mutagenita dimerů thyminů spočívá v narušení struktury DNA a tím k zastavení DNA polymerázy při replikaci. Opakované přerušení replikace bez oprav vzniklých chyb v nově vznikajících řetězcích vede k substitucím, deletcím nebo tvorbě chromozomálních zlomů. [27]

Ionizující záření má vyšší energii než UV záření a je schopno pronikat tkáněmi. Zařazujeme zde α , β , a γ -záření nebo RTG paprsky. Expozice člověka tomuto záření však není tak běžná, jako je tomu u UV záření. Energie ionizačního záření je dostatečně vysoká k tomu, aby ionizovala atomy, kterými je pohlcena. Principem radiačního poškození tkání je fotolýza vody, při níž vznikají reaktivní radikálové částice (hydroxylový a vodíkový), ale i přímé poškození DNA (vznik zlomů). Radikálové částice vyvolávají další reakce s buněčnými strukturami. Typickým poškozením vyvolaným tímto druhem záření je tvorba jedno i dvouvláknových zlomů v DNA, cross-linků, lokálních denaturací a modifikací bází. [28]

Biologické mutageny

Biologické mutageny jsou zejména viry. Virová nukleová kyselina a proteiny jsou pro zasaženou buňku cizorodým materiálem, který může interagovat s jejími vlastními molekulami a narušovat jejich funkci. Mechanismus spuštění maligní transformace virem je různý. Dědičná informace DNA virů obsahuje onkogen kódující T-antigen. Produkt tohoto genu se váže na produkty tumor supresorových genů a tím je inaktivuje. Tento mechanismus je typický zejména pro papilomaviry, které mohou indukovat vznik nádorů děložního čípku nebo nádorů hlavy a krku. RNA onkogenní retroviry přímo ve své dědičné informaci onkogen nemají. Po vstupu viru do buňky je RNA přepsána do molekuly DNA a začleněna do genomu hostitelské buňky. V průběhu začlenění cizorodé DNA může dojít k narušení sekvence buněčného protoonkogenu, který se takto může změnit v onkogen. Buněčný onkogen se může také dostat pod kontrolu silného virového promotoru, následuje jeho zvýšená exprese vedoucí ke stimulaci buněk k nadměrnému dělení. Retroviry způsobující maligní transformace lidských buněk jsou např. HTLV-1, HTLV-2 a KSHV způsobující leukémii, lymfomy a Kaposiho sarkom. [21]

Chemické mutageny

Chemické mutageny jsou širokou škálou látek zahrnujících kontaminanty životního prostředí, látky cigaretového kouře, barviva i některé škodliviny obsažené v přepálených potravinách nebo uzených výrobcích. Rozdělují se podle mechanismu účinku na analogy bází a látky modifikující báze. [25]

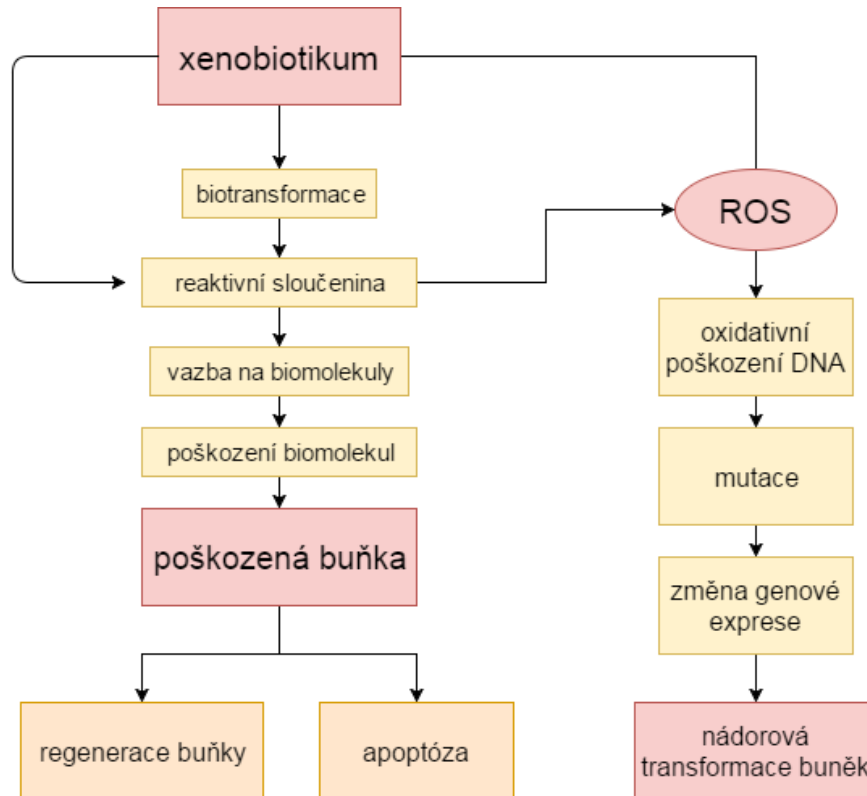
Mutagenní účinek analogů bází se projevuje při replikaci DNA. Tyto látky se inkorporují do DNA a způsobují chybné párování bází vedoucí k mutacím. Analogy bází se často užívají při studiu mutagenních procesů. Nejpoužívanější je 5-bromuracil, analog thyminu. Na rozdíl od

tyminu je na uhlíku C5 místo metylu vázán brom, který významně posouvá rovnováhu směrem k existenci enolové formy (ketoforma se páruje s adeninem, enolforma s guaninem).

Látky modifikující báze představují poměrně širokou a různorodou skupinu chemických látek. Nejčastějším mechanismem poškození je oxidace nebo alkylace DNA. V případě metylačních činidel může být dopad na fyziologii buňky velmi vážný. Metylační status genů totiž hraje významnou roli v regulaci jejich exprese. Látky modifikující báze tak vykazují mutagenní účinek i na DNA, která se nereplikuje. Mezi alkylační látky řadíme alkylsulfáty a N-nitrososloučeniny. Alkylační činidla kromě změny metylace genů způsobují také nesprávné párování bází, popřípadě se nepárují vůbec nebo způsobují meziřetězcové křížové vazby. Další skupinou látek jsou hydroxylační činidla (hydroxylaminy), deaminační činidla (kyselina dusitá, hydrogensířčitany) nebo interkalační látky (etidumbromid, akridiny, psoraleny). [24] [25]

2.3.2 Oxidační stres

Oxidační stres je definován jako převaha reaktivních forem kyslíku nad antioxidační kapacitou organismu. Některé z výše zmíněných mutagenních látek působí mechanismem tvorby reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS) a jsou tak příčinou oxidačního stresu (obrázek 6). Kromě těchto exogenních látek oxidační stres způsobují také vlastní fyziologické pochody organismu - dýchací řetězec, oxidační vzplanutí bílých krvinek. ROS jsou také významnou součástí buněčné signalizace. Mezi ROS patří superoxid, peroxid a hydroxylový radikál. Superoxid není zdaleka tak reaktivní jako jeho protonovaná forma. Vůbec nejreaktivnější je hydroxylový radikál, k jehož vzniku dochází v přítomnosti Fe^{2+} nebo Cu^+ . Proto buňky pečlivě střeží nakládání s železnatými ionty (je uchováváno ve feritinu, kde nemůže reagovat). Limitujícím faktorem rychlosti reakce hydroxylového radikálu s ostatními molekulami je pouze difúze. [27]



Obrázek 6 - Schéma působení xenobiotik jako induktorů oxidačního stresu

Reakcí ROS s nukleovými kyselinami dochází k modifikacím bází – typická je oxidace guanosinu volným hydroxylovým radikálem, který se pak páruje s adeninem nebo nahrazení NH_2 skupiny adeninu za OH , který pak vytváří pár s cytosinem. Druhým výstupem je štěpení cukr-fosfátové kostry vedoucí k tvorbě zlomů v DNA. Dlouhodobé vystavení organismu ROS ať už prostřednictvím chronických zánětů nebo díky vnějším faktorům (UV záření, xenobiotika) vede k poškození DNA a vzniku mutací. Podíl oxidačního stresu na vzniku nádorového bujení je tak nezpochybnitelný. [29]

Antioxidační strategie

Mechanismy, které tělo využívá pro boj s oxidačním stresem lze rozdělit na enzymové a neenzymové využívající malé molekuly antioxidačních látek. Hlavními enzymy, které eliminují ROS, jsou superoxid dismutáza a peroxidázy (kataláza a glutathion peroxidáza). Superoxid dismutáza (SOD) katalyzuje dismutaci (oxidačně-redukční reakci dvou molekul téže látky) superoxidu. Je to rychlý a efektivní enzym, nepotřebuje obě molekuly superoxidu zároveň, katalyzuje jejich přeměnu postupně. Lidský organismus obsahuje dvě formy tohoto enzymu: SOD I, která se vyskytuje v cytoplasmě (kofaktorem je atom mědi nebo zinku) a mitochondriální SOD II (kofaktor je mangan). Peroxidázy eliminují peroxid vodíku dvouelektronovou redukcí. Enzymy, které tuto reakci zprostředkovávají, jsou kataláza, která elektrony nutné k redukci získává z druhé molekuly peroxidu (jedná se vlastně také o dismutaci). Druhým enzymem je glutathion peroxidáza, která jako donor elektronů využívá molekulu glutathionu. Aktivní místo tohoto enzymu obsahuje selenocystein. Enzymy a reakce katalyzované zmíněnými enzymy shrnuje tabulka 2. [27] [30]

Tabulka 2 - Enzymy a reakce antioxidačních mechanismů

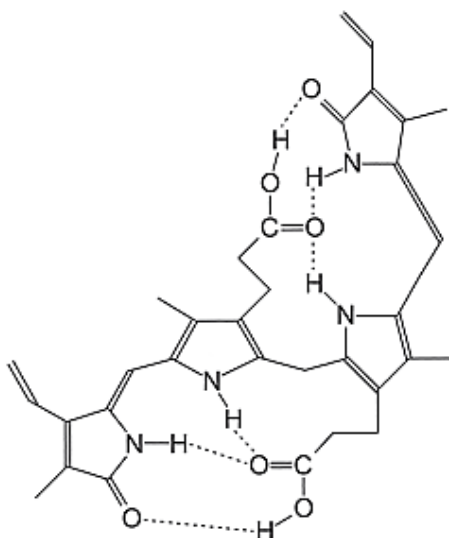
enzym	kofaktor	substrát	reakce
superoxid dismutáza	Cu, Zn nebo Mn	superoxid	$2 \text{O}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
kataláza	Fe	peroxid	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
glutathion peroxidáza	Se		$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$

Zmíněné enzymové systémy nemohou katalyzovat eliminaci ROS v membránách. Ta je zprostředkována malými lipidickými molekulami s antioxidačními vlastnostmi. Tyto antioxidanty s reaktivními částicemi přímo reagují a samy se tak stanou volnými radikály. Drtivá většina antioxidantů má systém konjugovaných dvojných vazeb, které stabilizují přijatý nepárový elektron, a tudíž nejsou reaktivní natolik, aby poškozovaly buněčné struktury. Důležitým antioxidantem je koenzym Q₁₀, který se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně, kde je koncentrace ROS díky přítomnosti dýchacího řetězce velmi vysoká. V ostatních částech buňky zajišťuje vycytávání volných radikálů vitamín E. Regenerace koenzymu Q₁₀ probíhá dismutací dvou molekul ubisemichinonu nebo je sám ubisemichinon regenerován v dýchacím řetězci. Vitamín E je regenerován předáním elektronu na molekulu vitamínu C, který je následně regenerován glutathionem. Radikál vitamínu E může také reagovat ještě s druhým radikálem, dojde k nevratné oxidaci a výsledný produkt je vyloučen žlučí. Další významnou fyziologickou antioxidační molekulou je bilirubin diskutovaný v kapitole níže. [27] [29]

2.4 Bilirubin

2.4.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Bilirubin je nepolární sloučeninou, což je zásadní vlastnost ovlivňující jeho transport a úlohu v organismu. Přirozenou formou bilirubinu v těle je 4Z,15Z-bilirubin IX_α. V molekule bilirubinu jsou sice polární postranní skupiny, ty ale společně tvoří intramolekulární vodíkové můstky a udržují tak molekulu nekonjugovaného bilirubinu v nepolárním stavu a v trojrozměrné konformaci (obrázek 7). [30]



Obrázek 7 - Struktura nekonjugovaného 4Z,15Z-bilirubinu IX_α [30]

Konstituční izomerie molekuly bilirubinu:

Dle štěpeného methinového můstku v molekule hemu rozlišujeme tyto čtyři konformační izomery: bilirubin IX α , IX β , IX γ a IX δ . První jmenovaný je v dospělém lidském organismu převažujícím izomerem. Zbylé tři se vyskytují ve stopových množstvích, kromě izomeru IX β , který se ve větší míře vyskytuje u novorozenců. Vzhledem k jeho struktuře není, podobně jako izomery IX γ a IX δ , schopen tvořit intramolekulární vodíkové můstky, čímž se zvyšuje jeho hydrofilita a může tak být vyloučen žlučí bez konjugace.

Spontánním rozštěpením bilirubinu IX α na dvě molekuly a jejich následným náhodným opětovným spojením v lineární tetrapyrrol mohou vzniknout tři následující izomery: III α , IX α a XIII α .

Konfiguraci cis/trans určuje poloha pyrrolových jader vůči sobě. Jejich konfigurace má za následek změnu polaritu sloučeniny a tedy i její následnou schopnost eliminace. 4Z,15Z bilirubin je snadno fotoexcitován za současné změny konfigurace a přechází tak na polárnější deriváty zvané lumirubin, cyklobilirubin nebo fotobilirubin II, které mohou být vyloučeny žlučí bez konjugace. Tohoto principu se využívá při terapii novorozenecké žloutenky nebo pro potlačení projevů hypebilirubinemie u Crigler-Najjarova syndromu I. [30]

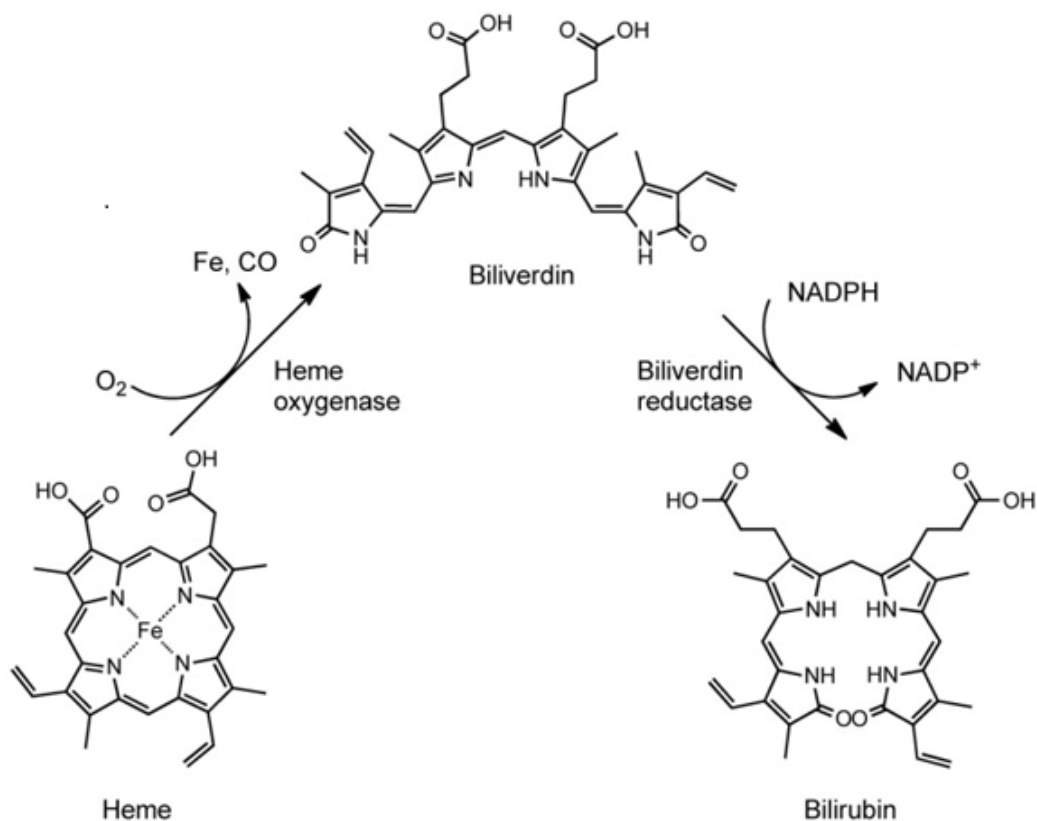
2.4.2 Degradace hemu

Hemová struktura patří mezi tetrapyrrolové sloučeniny. Je součástí celé řady hemoproteinů (hemoglobinu, myoglobinu, cytochromů). Dále mezi tetrapyrrolové sloučeniny patří také chlorofylová barviva a fytybilyny sloužící jako rostlinné pigmenty a v neposlední řadě i koriny mezi než patří vitamin B₁₂ neboli kobalamin. Ty se od hemu liší jak uspořádáním cyklické struktury porfyrinu, tak i centrálně vázaným atomem kovu. V případě chlorofylu je zde vázán iont hořčíku, vitamín B₁₂ váže iont kobaltu. [31]

Hem určený k degradaci v lidském těle pochází převážně ze stárnoucích červených krvinek. Jejich životnost je průměrně 120 dní. Zbylé hemové struktury pocházejí z cytochromů a dalších molekul obsahujících hem, jejichž obrat je v těle rychlejší. Stárnoucí červené krvinky jsou odstraněny z krevního řečiště a degradovány ve slezině. Globinová složka hemoglobinu je rozložena na aminokyseliny a samotný hem podstupuje oxidativní štěpení. [3]

1) Prvním krokem degradace je štěpení α -methinového můstku, čímž se přeruší cyklická struktura a vzniká lineární tetrapyrrolová struktura zvaná **biliverdin**. Tato reakce je katalyzována hemoxygenázou. Při štěpení dochází k uvolnění železa a oxidu uhelnatého, o kterém se předpokládá, že plní v organismu signální či regulační úlohy.

2) Následuje redukce středového methinového můstku biliverdinu za vzniku **bilirubinu IX α** . Reakce je katalyzována biliverdinreduktázou, jejímž kofaktorem je NADPH. Biliverdinreduktáza se vyskytuje společně s hemoxygenázou, což vysvětluje, proč v krevním séru nedetekujeme volný biliverdin. Reakce degradace hemu na bilirubin je znázorněna na obrázku 8.



Obrázek 8 - Degradace hemové struktury [32]

3) Vzniklý nekonjugovaný bilirubin se dostává portálním řečištěm do jater. Protože se jedná o nepolární sloučeninu, jeho transport do jater je zprostředkován vazbou na sérový albumin. V játrech je pak konjugován s kyselinou glukuronovou, reakce je katalyzována uridindifosfátglukuronid transferázou 1A1 a vzniká bilirubindiglukuronid, jehož rozpustnost ve vodě je vyšší a může tak být eliminován žlučí pryč z těla. Více o konjugaci a funkci bilirubinu v kapitole 2.4.6 Funkce bilirubinu v organismu. [3] [30]

Hemoxygenáza

Hemoxygenáza katalyzuje oxidační štěpení methinového můstku hemu za vzniku lineární tetrapyrrolové molekuly biliverdinu. V lidském organismu existují dvě isoformy tohoto enzymu: hemoxygenáza-1 a hemoxygenáza-2. První z enzymů se uplatňuje především při zvládnutí oxidačního stresu, jeho exprese je indukovatelná volnými kyslíkovými radikály, těžkými kovy, UV zářením, zvýšeným množstvím hemoglobinu při hemolýze nebo i léky (kyselinou acetylsalicylovou, statiny nebo imunosupresivními látkami). Hemoxygenáza-2 je naproti tomu konstitutivním enzymem. Je produkována v různých tkáních, zejména pak centrálním nervovým systémem, endotelovými buňkami, játry a stěvy. Hemoxygenáza není jen enzymem, ale v jádře plní funkci transkripčního faktoru a je také signální molekulou na buněčné membráně. [30]

Billiverdinreduktáza

Billiverdin reductáza katalyzuje přeměnu billiverdinu na bilirubin redukcí methinového můstku. Jedná se o všudypřítomný enzym, převážná část je ho ale v cytosolu. V těle se nachází společně s hemoxygenázou. Díky tomu je billiverdin okamžitě zpracováván a jeho

množství v séru je téměř nedetekovatelné. Zajímavé je také, že tento enzym má dvě pH optima a je schopen autofosforylace, což zvyšuje jeho aktivitu. Toho je využíváno při zvýšeném oxidačním stresu organismu, protože vzniklý bilirubin disponuje antioxidačními vlastnostmi. Billiverdinreduktáza má také kinázovou aktivitu, je tedy schopna účastnit se buněčné signalizace a je schopna i přenosu do jádra, kde plní úlohu transkripčního faktoru. [30] [33]

2.4.3 Transport bilirubinu

Po rozpadu hemu se bilirubin dostává do systémové cirkulace, odkud putuje do jater. Denní produkce bilirubinu činí přibližně 250-350 mg, z čehož 75-80 % pochází z rozpadu červených krvinek. Vzhledem k jeho nerozpustnosti ve vodě je transport zajištěn navázáním na sérový protein albumin. Takto je přenášeno asi 90 % veškerého bilirubinu, zbylých 10 % je vázáno na apolipoprotein D HDL-lipoproteinu. Albumin má ve své molekule vysoce afinitní vazebné místo, na které se bilirubin váže iontovými vazbami. Kapacita albuminu pro transport bilirubinu činí až 600 $\mu\text{mol/l}$, což značně přesahuje fyziologické hodnoty v krvi (celková denní produkce bilirubinu dosahuje průměrně 450-600 μl). Některé léky a také volné mastné kyseliny mají schopnost soutěžit s bilirubinem o vazebné místo v molekule albuminu, což zvyšuje hladinu volného bilirubinu v séru.

Existují jedinci se vzácným onemocněním, u kterých nedochází k produkci albuminu. Transport bilirubinu albuminem je ale zcela schopen nahradit HDL-lipoprotein spolu s ostatními sérovými proteiny.

Do jater se bilirubin dostává přes bazolaterální (sinusoidální) pól hepatocytu – bilirubin disociuje z vazby na albumin a váže se na transportní protein, kterým je transportován do cytosolu. Jiný než volný bilirubin není přes bazolaterální membránu transportován. V cytosolu je bilirubin vázán na intracelulární proteiny, což zabraňuje jeho transportu ven z buňky. Navzdory proteinům vázajícím bilirubin v cytosolu, je asi polovina bilirubinu asociována s membránami endoplazmatického retikula jaterních buněk. [3] [30]

2.4.4 Konjugace s kyselinou glukuronovou

Volný bilirubin kvůli jeho nepolární povaze není schopen exkrece. Konjugací s kyselinou glukuronovou se však jeho polarita zvýší natolik, že může být z těla vyloučen pomocí žluči. Konjugaci bilirubinu s kyselinou glukuronovou katalyzuje enzym UDP-glukuronosyl transferáza (UGT1A1).

V procesu glukuronidace jsou na karboxyetylové zbytky molekuly bilirubinu esterovou vazbou navázány dvě molekuly glukuronové kyseliny a vzniká bisglukuronosyl bilirubin. Díky vazbě kyseliny glukuronové dojde ke změně trojrozměrné struktury molekuly a uvolnění dvou vodíkových můstků, které brání expozici polárních skupin. [30]

2.4.5 Vyloučení konjugovaného bilirubinu

Bisglukuronosyl bilirubin je hepatocyty vyloučen do žluče přes apikální pól. K transportu přes membránu dochází aktivním transportním systémem proti koncentračnímu gradientu za spotřeby ATP. Bilirubin se dostává do žlučovodů. Při transportu žlučovody je ale malá část konjugovaného bilirubinu štěpena β -glukuronidázou produkovanou hepatocyty a výstelkou žlučových cest. Množství β -glukuronidázy zdravého jedince není významné, roste však při infekci žlučových cest patogenními mikroorganismy, které tento enzym produkují. Takto

zvýšená hydrolýza konjugovaného bilirubinu může vézt až k vytvoření precipitátů nekonjugovaného bilirubinu, které jsou příčinou vzniku barevných žlučových kamenů. Ucpání žlučových cest vede k akumulaci žlučových kyselin a přetlaku ve žlučových cestách. Těsná spojení hepatocytů jsou tímto tlakem přerušena a konjugovaný bilirubin se může dostávat zpět do cirkulace.

Za normálního fyziologického stavu je ale bilirubin žlučí transportován do střevního lumenu. Prochází z tenkého střeva do tlustého, které je osídleno koliformními bakteriemi. Ty produkují β -glukuronidázu a mohou bilirubin dekonjugovat. Anaerobní bakterie přítomné ve střevě zase produkují oxidoreduktázy, kterými je bilirubin redukován na množství sloučenin souhrnně nazývaných jako urobilinoidy. Urobilinoidy jsou spolu s částí stále ještě konjugovaného bilirubinu vyloučeny stolicí. [30]

2.4.6 Funkce bilirubinu v organismu

Bilirubinu byl donedávna považován spíše za produkt toxický, jehož rychlá eliminace z organismu je nezbytná. Novorozenecká hyperbilirubinémie je prokazatelně neurotoxická, avšak poslední studie prokazují i jiné, pozoruhodné biochemické vlastnosti bilirubinu. Připisují mu protektivní vlastnosti v boji proti oxidačnímu stresu, který je jednou z příčin aterosklerózy, rakoviny, autoimunitních a degenerativních onemocnění. [34]

Antioxidační vlastnosti

První studie prokazující antioxidační vlastnosti bilirubinu byly publikovány již v roce 1954, kde bylo zjištěno, že schopnost bilirubinu zabraňovat oxidaci nenasycených mastných kyselin je mnohem silnější, než jakou disponuje vitamín E. Následující studie prokázaly také jeho schopnost zhaset singletový kyslík, zneškodňovat peroxylové radikály a superoxidové anionty. Dalšími protektivními vlastnostmi bilirubinu jsou schopnost zabránit oxidaci lipoproteinů (LDL) a proteinů a snižovat karbonylaci bílkovin. Všechny tyto vlastnosti platí pro nekonjugovaný bilirubin. [30][35]

Velká antioxidační kapacita bilirubinu je vysvětlována dvěma způsoby. Prvním vysvětlením je in vitro potvrzená existence bilirubin-biliverdinového cyklu. Bilirubin tak po zneškodnění oxidační částice může být opět regenerován, což vysvětluje jeho velký podíl na antioxidační kapacitě séra, přestože jeho koncentrace v oběhu jsou nízké. Schopnost likvidovat reaktivní částice souvisí se strukturou bilirubinu, který nese na uhlíku C-10 metylenovou skupinu. Ta je donorem elektronů pro radikálové částice. Druhým doplňujícím vysvětlením je schopnost bilirubinu inhibovat produkci superoxidu NADPH-oxidázou, která je hlavním zdrojem oxidantů ve fagocytárních i jiných buňkách. [30]

2.5 UDP-glukuronosyl transferázy (UGT)

Uridindifosfoglukuronosyl transferázy jsou označovány zkratkou UDPGT či UGT (dále jen UGT), podle systému klasifikace enzymů Mezinárodní biochemické unie jsou označeny číslem EC 2.4.1.17. [36]

UGT jsou klíčovou skupinou enzymů, díky jejichž aktivitě je organismus schopen předejít potenciálně toxické akumulaci exogenních i endogenních lipofilních látek a zahájit jejich eliminaci z těla skrze moč nebo žluč. Tento eliminační proces je umožněn zvýšením hydrofility lipofilních látek, a to navázáním glukuronové kyseliny z uridindifosfoglukuronidu na molekulu eliminované látky právě za katalýzy těmito transferázami. Strukturní rozmanitost

látek, jejichž glukuronidaci tyto enzymy katalyzují, je velká, neboť jsou schopny přenášet glukuronid na rozličné funkční skupiny – hydroxyly, karbonyly, karboxyly, sulfuryly či aminoskupiny. Nejčastějšími substráty endogenního původu jsou bilirubin, steroidní pohlavní hormony či hormony štítné žlázy, exogenními substráty pak léky, potenciální jedy či nepřeberné množství sloučenin přírodního i syntetického původu. [6]

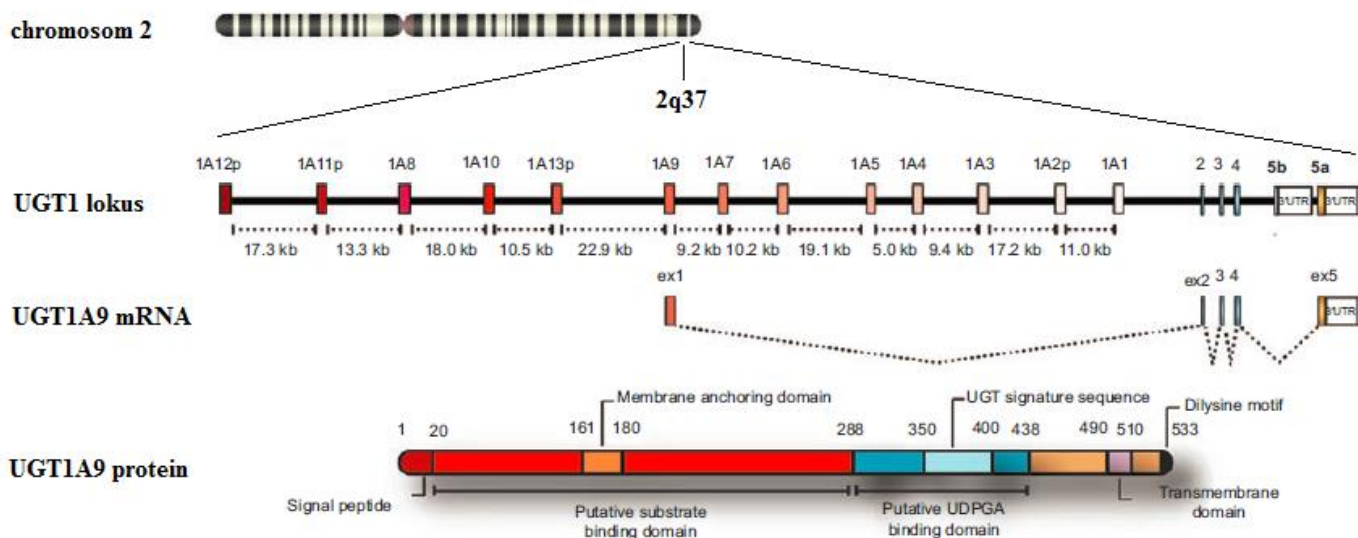
U eukaryotních organismů se vyvinulo několik strategií, které umožňují takto širokou variabilitu proteinů či enzymů, aniž by v jejich genomu muselo existovat několik genů kódujících tyto enzymy zvlášť, což by pro buňku bylo složitější a energeticky náročnější. UGT geny jsou dobrým příkladem tohoto úsporného systému kódování proteinů. Eukaryotní geny se totiž skládají z menších kódujících sekvencí – exonů a mezi nimi vložených delších nekódujících sekvencí – intronů. Odstraněním intronů v procesu sestřihu pre-mRNA je vytvořena m-RNA, tedy matrice pro translaci sekvence RNA do řetězce aminokyselin tvořícího protein. A právě různé kombinace exonů při sestřihu pre-mRNA vedou nakonec v procesu translace k proteinům s různými funkcemi, u UGT konkrétně k enzymům s různou sekvencí aminokyselin tvořící vazebné místo proteinu, potažmo tedy konformaci vazebného místa pro substrát. Takovéto enzymy pak disponují rozličnou substrátovou specifitou.

Uridindifosfoglukuronosyl transferázy se u člověka rozdělují do dvou skupin, a to na UGT1A a UGT2, které se ještě dále dělí na UGT2A a UGT2B. Sekvenční varianty pro všechny enzymy ze skupiny UGT1A se nacházejí na jediném lokusu 2q37, pro UGT2A i UGT2B je lokus na chromozomu 4q13. [6]

2.5.1 Gen UGT1A

Lokus UGT1 je tvořen téměř 200 000 páry bází. Je složen celkem ze 17 exonů. Exon 1 kóduje doménu, která je zodpovědná za vazbu substrátu a existuje celkem ve 13 variantách. Zbylé čtyři exony jsou konstantní pro všechny varianty enzymu. Celkem by tedy alternativním sestřihem s následnou translací mohlo vzniknout až 13 různých enzymů, reálně však dochází ke tvorbě pouze devíti isoform mRNA vedoucích k funkčním enzymům (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10). Exony 2, 11, 12 a 13 nejsou přepisovány, označují se jako tzv. pseudogeny. Uspořádání genu a proteinu ze skupiny UGT1A ilustruje obrázek 9. Na obrázku je znázorněn sestřih genu pro enzym UGT1A9, analogicky jsou pak sestřihovány i geny kódující ostatní enzymy této rodiny vždy s příslušícím prvním exonem.

V exonu 1 bylo zaznamenáno mnoho polymorfismů, zejména nesynonymních mutací. Vzhledem ke skutečnosti, že exon 1 souvisí se substrátovou specifitou výsledného enzymu, lze tyto četné polymorfismy vysvětlit jako reakci buněk na měnící se environmentální faktory. UGT1A je tedy lokusem vyvíjejícím se a schopným vyrovnávat se s vnějšími vlivy. To dokládá i fakt, že některé mutace jsou častější v určité skupině lidské populace, která je vystavena jinému environmentálnímu tlaku než zbytek populace. [37]

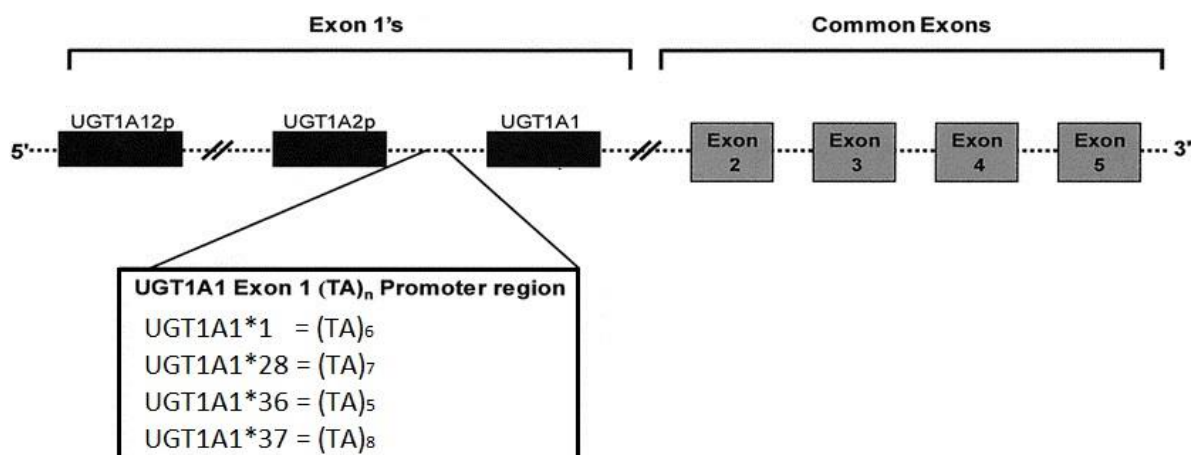


Obrázek 9 - Gen *UGT1* kódující glukuronosyl transferázy s různou substrátovou specifitou. Příklad alternativního sestřihu pro gen *UGT1A9* [37]

Expresce každé mRNA pro daný UGT1A enzym je řízena vlastním promotorem, což umožňuje buňce odpovídat na rozmanité fyziologické i patofyziologické stimuly. Produkce těchto enzymů je také různá v závislosti na tkáni i mezi jedinci. Většina z této skupiny enzymů je sice produkována zejména v gastrointestinálním traktu a hlavně játrech, některé jsou ale produkovány také v extrahepatálních tkáních (*UGT1A7*, *1A8*, *1A10*), mozku, vaječnicích, prostatě, děloze či prsech. [37]

2.5.2 Gilbertův syndrom

Gilbertův syndrom je autozomálně recesivní geneticky podmíněná zvýšená hladina nekonjugovaného bilirubinu v krevním séru – tzv. hyperbilirubinémie, která není spojená se zvýšenou hemolýzou nebo poškozením jater. Jedinci s Gilbertovým syndromem vykazují polymorfismus genu pro UDP-glukuronosyl transferázu 1A1. Promotorová sekvence nemutovaného (wild-type) genu obsahuje v TATA boxu 6 TA repetitivních sekvencí (obrázek 10). U Gilbertova syndromu nacházíme v TATA boxu inzerci TA páru na obou alelách genu pro UDP-glukuronosyl transferázu – typ 7TA/7TA. Zvýšení počtu TA páru má za následek zhoršení rozpoznání vazebného místa pro transkripční faktor. Dochází tak k poklesu exprese enzymu, tím se jeho aktivita snižuje asi na 30 % oproti jedincům s typem 6TA/6TA a dochází ke zvýšení hladiny nekonjugovaného bilirubinu. Heterozygotní genotyp 6TA/7TA se fyziologicky zvýšenou hladinou bilirubinu neprojevuje. Polymorfismy inzerce TA dinukleotidu v promotorové oblasti spolu s jejich nomenklaturou jsou zobrazeny na obrázku 10. [38]



Obrázek 10 - Polymorfismy v promotorové oblasti genu *UGT1A1* [39]

Vzhledem k nezávažným projevům Gilbertova syndromu, které nevyžadují léčbu, nejsou v Česku známá přesná čísla mapující tento syndrom. Testování za účelem diagnostiky Gilbertova syndromu se provádí pouze, pokud má jedinec zvýšenou hladinu bilirubinu v krvi, ale ostatní nálezy jsou negativní (například testy jaterních transamináz) nebo ji nelze vysvětlit jinak. Specifické fyziologické příznaky totiž Gilbertův syndrom nedoprovázejí. Zahraniční studie uvádí výskyt Gilbertova syndromu v indoevropské populaci mezi 5-10 % s častějším výskytem u mužů. Normální hladina nekonjugovaného bilirubinu v krvi se pohybuje mezi 5-17 $\mu\text{mol/l}$. Jedinci s Gilbertovým syndromem mají hladinu nekonjugovaného bilirubinu zvýšenou tj. 20-70 $\mu\text{mol/l}$ (výjimečně až 100 $\mu\text{mol/l}$), zatímco hladina konjugovaného bilirubinu se u těchto jedinců neliší. [30]

2.5.3 Protektivní role Gilbertova syndromu proti vzniku nádorů

Oxidační stres je charakterizován jako převaha reaktivních sloučenin kyslíku nebo dusíku nad antioxidační kapacitou. Volné radikály tak mohou interagovat s DNA, vytvářet mutace a způsobit genovou dysregulaci. Zvýšená hladina bilirubinu v krvi může tomuto poškození předcházet a působit tak preventivně proti vzniku karcinomů. U plazů, ptáků i obojživelníků končí degradační dráha hemu biliverdinem, který je vyloučen. Savčí degradace hemu zahrnuje navíc redukci biliverdinu a konjugaci vzniklého bilirubinu. Jak syntéza, tak následná eliminace bilirubinu vyžadují energii navíc. Evolučními mechanismy se vyvíjejí metabolické procesy, které jsou úsporné a zároveň účelné. Pokud tedy tvorba a vyloučení bilirubinu vyžadují energii navíc, je nasnadně hledat u bilirubinu funkci, kvůli které se organismu vyplatí tuto energii investovat. Relativně vysoký výskyt Gilbertova syndromu vyvolává dojem, že mírně zvýšená hladina bilirubinu je adaptivní. Tuto hypotézu podporují i mnohé studie prokazující korelaci mezi zvýšenou hladinou bilirubinu a sníženým rizikem kardiovaskulárních chorob, kde oxidační stres také sehrává důležitou roli.

Studie vědců Wei a spol. na více než 17 000 pacientech prokázala vztah mezi sníženou hladinou nekonjugovaného bilirubinu a zvýšeným rizikem vzniku rakoviny. Průměrná hladina bilirubinu u nádorových pacientů činila 11,3 $\mu\text{mol/l}$ zatímco u zdravých jedinců byla průměrně 13,7 $\mu\text{mol/l}$. [40]

In vitro studie prokázaly také antiproliferační účinek bilirubinu. Vědci Zucker a spol. prokázali, že proliferace buněk nádoru prsu je v závislosti na dávce inhibována

nekonjugovaným bilirubinem. Mechanismem je indukce apolipoproteinu D, který je mimo jiné přenašečem bilirubinu v plazmě. V této souvislosti je zajímavé, že zvýšená hladina apolipoproteinu D je spojována s lepší prognózou rakoviny prsu i prostaty – tedy pokud je v nádorové tkáni exprimováno více apolipoproteinu D, je zde zároveň naváděno také větší množství bilirubinu. Samotná zvýšená hladina bilirubinu tedy podle této studie přináší protektivní efekt a lepší prognózu pacientů s karcinomem prsu ale i prostaty. Otázkou ale zůstává, jaký vliv má samotné snížení exprese genu pro UDP-glukuronosyl transferázu 1A1, která sice způsobuje zvýšení hladiny nekonjugovaného bilirubinu, její nízká aktivita vede ale zároveň k pomalé biotransformaci estrogenu. Ta je v asijské a černošské populaci spojována s vyšším rizikem karcinomu prsu. V kavkazské populaci podobný trend pozorován nebyl. Role Gilbertova syndromu se tak u nádorů prsu jeví jako ambivalentní. [41] [42]

V následující studii stejná skupina vědců prokázala v *in vitro* ale také v epidemiologické studii protektivní efekt bilirubinu proti vzniku kolorektálního karcinomu podobně jako studie z Karlovy univerzity v Praze. Ta srovnávala promotorové polymorfismy genu UGT1A1 u 777 pacientů s kolorektálním karcinomem a u 986 zdravých kontrol. Výsledky této studie ukazují, že frekvence Gilbertova syndromu je u zdravých kontrol statisticky významně vyšší než u pacientů s kolorektálním karcinomem. Výsledky také potvrdily nižší hladinu bilirubinu a tím potenciálně slabší antioxidační kapacitu séra u nádorové skupiny. [43] [44]

2.6 Glutathion S-transferázy

Glutathion S-transferázy (GST) ve starší literatuře nazývané též ligandiny jsou enzymy katalyzující přenos glutathionu na substrát obsahující elektrofilní atom. Reakce obvykle snižuje reaktivitu substrátu vzhledem k intracelulárním molekulám a zvyšuje hydrofilitu. Mimo to také váží, uskladňují a přenášejí látky, které nejsou substráty pro konjugaci jako hem, bilirubin, steroidní látky, azo-barviva či polycyklické aromatické sloučeniny. V systému nomenklatury enzymů jim náleží označení EC 2.5.1.18. [2] [45]

Glutathion S-transferázy jsou kódovány dvěma superrodinami genů. První z nich obsahuje nejméně 16 genů, jejichž produkty jsou glutathion transferázy nacházející se v cytosolu, zatímco druhá obsahuje nejméně 6 genů, které jsou vázány na membrány. Většina typů glutathion S-transferáz jsou dimerní enzymy složené z identických podjednotek. Každá podjednotka se skládá z 200 až 240 aminokyselin a obsahuje pouze jedno katalyticky aktivní centrum. Podle aminokyselinové sekvence byly cytosolové GST rozděleny do osmi tříd (alfa, mý, pí, théta, kappa, sigma, chí a zéta). Některé z enzymů obou superrodin vykazují kromě konjugační také glutathion peroxidázovou aktivitu a steroid a prostaglandin izomerázovou aktivitu. [46]

Mikrosomální i cytosolové GST hrají významnou roli v detoxifikaci škodlivých látek a eliminaci oxidačního stresu (detoxifikují oxidované lipidy a produkty reakcí DNA s radikály). Glutathion S-transferázy mají širokou vzájemně se překrývající substrátovou specifitu. Neexistuje však substrát společný pro všechny tyto enzymy. Cytosolové GST, zejména třídy alfa, mý a pí se účastní eliminace α,β -nenasyčených karbonylových sloučenin jako je akrolein (obsažený v cigaretovém kouři, uzeninách apod.), 4-hydroxynonenal (produkt peroxidace lipidů), propenaly adeninu a thyminu (vznikají při oxidačním poškození DNA) nebo oxidačních produktů katecholaminů. *In vitro* byla prokázána schopnost GSTM1 katalyzovat

konjugaci glutathionu s karcinogenními epoxidy (např. aflatoxin B1-8,9-epoxid) a schopnost GSTP1 eliminovat diolové epoxidy polycyklických aromatických uhlovodíků. Zatímco zmíněné třídy GST eliminovaly spíše objemné halogenované uhlovodíky, třída théta katalyzuje konjugaci menších molekul dihaloalkanů – dichlormetanu (součást nátěrových hmot a plastů) nebo dibromoetan (složka paliv). Přehled cytosolových glutathion S-transferáz a jejich substrátů spolu s doplňujícími informacemi je uveden v tabulce 3. [2] [46]

Tabulka 3 - Typické substráty detoxifikované cytosolovými GST, upraveno podle [2] [46]

třída	lokace genu	protein	exprese ve tkáních (sestupně)	substrát
alfa	6p12	GSTA1	játra ≈ varlata >> ledviny > pankreas	akrolein, benzo(a)pyren7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid, styren oxid
mý	1p13.3	GSTM1	játra > varlata > mozek > ledviny ≈ nadledviny > plíce	aflatoxinB ₁ -epoxid, <i>trans</i> -4-fenyl-3-buten-2-on
pí	11q13	GSTP1	mozek > srdce ≈ plíce ≈ varlata > ledviny ≈ pankreas	akrolein, 4-vinylpyridin, adenin propenal, thymin propenal, DDT, <i>cis</i> -platina
sigma	4q31-22	GSTS1	kostní dřeň, játra plodu	PGD ₂ syntáza
théta	22q11	GSTT1	ledviny ≈ játra > tenké střevo > mozek ≈ prostata	dichlormetan, dibromomethan
zéta	14q24.3	GSTZ1	kosterní svalstvo, játra plodu	dichloroacetát, fluoroacetát
omega	10q23-25	GSTO1	játra ≈ srdce ≈ kosterní svalstvo > pankreas > ledviny	thioltransferáza

Mezi nejvíce studované GST patří třídy mý, théta a pí. Jejich exprese je závislá na typu tkáně, pohlaví, věku a zdravotním stavu jedince. Navíc je doposud známo asi 100 strukturně odlišných látek, které jsou schopny indukovat expresi těchto enzymů. Velká část z nich jsou přírodně se vyskytující látky obsažené například v citrusových plodech a brukvovité zelenině. Tyto látky jsou buď přímo substráty pro glutathion S-transferázy nebo musí projít první fází biotransformace přes cytochrom P450 a následně mohou podléhat konjugaci s glutathionem. Výživa je tak jedním z faktorů, který rovněž ovlivňuje regulaci genové exprese GST a hraje roli ve schopnosti buněk odolávat negativnímu působení xenobiotik. [47]

2.6.1 Polymorfismy glutathion S-transferáz

Glutathion S-transferázy, jak bylo již zmíněno výše, hrají významnou roli v biotransformaci cizorodých látek, zejména těch spojených s oxidačním stresem. Dá se tedy očekávat, že genové varianty kódující tyto enzymy, významně ovlivňují schopnosti buněk se s těmito látkami vypořádat. Polymorfismy byly popsány u mnoha cytosolových GST, pozornost je však soustředěna zejména na třídy GSTM, GSTT a GSTP. Obecně nejvíce studovaným polymorfismem jsou delece celých genů kódujících GSTM1 a GSTT1 - tzv. null alely (GSTM*0 a GSTT*0). Frekvence výskytu homozygotních delecí genu GSTM1 je v evropské populaci asi 50 %, zatímco frekvence homozygotní delece GSTT1 je nižší, udává

se asi 15-20 % (v asijské populaci je úplná delece obou alel přítomna u více než 60 % jedinců). Homozygotní jedinci pro null alely GSTM*0/*0 potažmo GSTT*0/*0 jsou plně deficientní pro daný enzym a jejich aparát biotransformace xenobiotik je tak o možnost takto zprostředkované eliminace škodlivých látek ochuzen. Heterozygotní jedinci vykazují normální aktivitu obou zmíněných glutathion S-transferáz stejně jako homozygotní jedinci vlastníci obě funkční alely genů (tzv. pozitivní homozygot). Takto přímočarý vztah mezi genotypem a fenotypovými projevy vyústil ve velký počet studií, které se zabývaly asociací mezi null genotypem a nejrůznějšími chorobami. [2]

2.6.2 Deficience GSTM, GSTT a vznik nádorů

Jednoznačná interpretace genotypu homozygotních i heterozygotních nositelů null alel GSTM1 i GSTT1 a zároveň finančně relativně nenáročná a jednoduchá diagnostika vedly k mnoha studiím zkoumající vliv deficience aktivity těchto enzymů a vzniku nádorů různého typu. Studie předpokládají, že jedinci s null genotypem mají sníženou schopnost obrany proti cytotoxickým produktům generovaných reaktivními kyslíkovými částicemi, a tudíž jsou náchylnější ke vzniku mutací, které mohou potenciálně vézt až k nádorové transformaci.

Vůbec nejčastěji studovaná je asociace null genotypu, kouření a vzniku rakoviny plic. Většina z těchto studií prokázala střední, statisticky významné zvýšení rizika vzniku plicního karcinomu u homozygotů GSTM*0/*0 oproti heterozygotům a pozitivním homozygotům. Tento vztah je podpořen také studiemi, které prokázaly vyšší hladiny aduktů polycyklických aromatických uhlovodíků s DNA u jedinců kuřáků s deficiencí GSTM1 oproti kontrolám s funkčními enzymy. U jedinců s deficiencí GSTT1 je předpokládána nižší schopnost metabolizace halogenů metanu vyskytujících se rovněž v cigaretovém kouři. Studií zabývajících se touto asociací je však méně a jejich výsledky nenasvědčují, že by null genotyp GSTT1 byl rizikovým faktorem pro vznik nádorů plic.

Mnohé další studie také prokázaly GSTM1 null genotyp jako rizikový faktor vzniku nádorů močového měchýře. Naopak u nádorů hlavy a krku asociace GSTM1 ani GSTT1 null genotypu prokázána nebyla. Studie na ostatních nádorových skupinách (kolorektální nádory, nádory prsu či prostaty) přinášely vzájemně diskrepantní výsledky. [46] [48]

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je řešení následujících dílčích úloh:

1. Rešerše zaměřená na charakterizaci enzymů účastnících se metabolismu xenobiotik a jejich úlohu v organismu.
2. Experimentální práce - stanovení frekvence polymorfismů vybraných genů v běžné populaci a v populaci s vybranými typy nádorů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál

DNA izolovaná z parafinových bločků, nativní tkáň nebo krve pacientů s různými typy nádorů. Vzorů DNA pacientů s karcinomem a kontrolní populace byly poskytnuty Laboratoři Agel Nový Jičín a Komplexním onkologickým centrem Nový Jičín. Všichni pacienti a jedinci z kontrolního souboru byli informováni o charakteru vyšetření a podepsali informovaný souhlas.

Analýza vybraných genů probíhala také na speciální kontrolní skupině, zde pojmenované jako kontrolní skupina II (KS II). Jedinci v této skupině jsou starší šedesáti let a u nich samotných ani u první linie jejich příbuzných se v průběhu života nevyskytlo žádné nádorové onemocnění. Přehled jednotlivých populací s počty jedinců je uveden v tabulce 4. Údaje o analýze promotorové oblasti genu UGT1A1 u kontrolní skupiny I (KS I) pocházejí z patnáctiletého screeningu Laboratoře molekulární biologie, OLG, Laboratoře Agel Nový Jičín. Analýza null alel genů GSTM1 a GSTT1 u kontrolní skupiny I a II stejně jako analýza promotorové oblasti genu UGT1A1 u kontrolní skupiny II je vlastní součástí této práce.

Tabulka 4 - Počet jedinců ve vyšetřovaných populacích (CRC: kolorektální karcinom, LC: karcinom plic, PAC: karcinom pankreatu, HNC: karcinom hlavy a krku, PC: karcinom prostaty, BC: karcinom prsu, KS I: kontrolní skupina I, KS II: speciální kontrolní skupina)

	CRC	LC	PAC	HNC	PC	BC	KS I (UGT1A1)	KS I (GST)	KS II
počet	401	99	135	44	171	271	1701	242	228

4.2 Chemikálie a přístrojové vybavení

4.2.1 Chemikálie

Ethanol 96% (Merck, Německo)

Ethidium bromid 1% (Sigma, ČR)

Nanášecí pufr Bromophenol Blue (Promega, USA)

TBE pufr – powder (Bioline, UK)

Akrylamid (Bio Basic Inc., USA)

N,N-methylenbisakrylamid (Bio Basic Inc., USA)

N,N,N',N'-tetrametyhlethylendiamin, TEMED (Bio Basic Inc., USA)

Peroxodisíran amonný (Bio Basic Inc., USA)

DNA ladder, HyperLadder™ 100 bp, (Bioline, UK)

QuickGene DNA tissue kit S (KURABO, Japonsko)

Agarosa (Bioline, UK)

4.2.2 Komponenty pro PCR a sekvenování

MyTaq™ DNA Polymerase, (Bioline, UK)

Big Dye Terminator Cycle Sequencing KitV1.1 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientifics, USA)

Pufr pro sekvenování (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientifics, USA)

Alkalická fosfatáza: Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 1 U/μL (Thermo Fisher, USA)

Exonukleáza: Exonuclease I (BioLabs, UK)

Primery pro promotorovou oblast genu UGT1A1 (Generi Biotech) [49]

Primery pro sekvenační analýzu genu UGT1A1 (Generi Biotech, navrženo v Laboratoři Agel)

Primery pro geny GSTT, GSTM (Generi Biotech) [50]

4.2.3 Přístroje a pomůcky

QuickGene Mini (KURABO, Japonsko)

Speedmill (AnalytikJena, Německo)

Centrifuga (Eppendorf, Německo)

Termostat Incucell (BMT Medical Technology, ČR)

Nanodrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer, (ThermoFisher Scientific, USA)

The Qubit® 3.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, USA)

Thermocycler (Labnet, UK)

Transiluminátor MULTIBAND TCP (Vilber Lourmat, Francie)

Pipetovací automat Biomek (Beckman Coulter, USA)

Sekvenátor ABI Avant 3100 (Applied Biosystems, ThermoFischer Scientific, USA)

Zdroj napětí pro elektroforézu, TFX-35.M (Clever, UK)

Sestava pro vertikální a horizontální elektroforézu (Clever, UK)

Mikropipety a příslušné špičky (Eppendorf, Německo)

Real-time PCR cycler (It-is life Science, Irsko)

4.3 Metody

4.3.1 Izolace DNA z periferní krve

Do sterilní umělohmotné šroubovací zkumavky (typ *Falcon*) o objemu 50 ml bylo napipetováno 2,5 ml krve a přidáno 9 ml *RBC* lyzačního roztoku. Směs byla vortexována a inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Následně byla centrifugována (3 850 rpm/15 min, 4 °C). Supernatant byl opatrně odpipetován, aby nedošlo k porušení sedimentu bílých krvinek. Opět bylo přidáno 2,5 ml *RBC* lyzačního roztoku a vortexováno, dokud se sediment znovu nerozpustil. Směs byla centrifugována (3 850 rpm/10 min, 4 °C). Supernatant byl opatrně odsán. K sedimentu bylo přidáno 1,5 ml *Cell lysis solution* a směs byla vortexována. Následovala inkubace přes noc při 37 °C. Po inkubaci bylo do vzorku přidáno 450 µl *Protein precipitation solution*, směs byla vortexována a centrifugována (2 000 rpm/10 min). Supernatant byl slit do zkumavky obsahující 1,5 ml isopropylalkoholu. Obsah zkumavky byl opatrně promíchán a vysrážená DNA byla odpipetována do čisté zkumavky obsahující 100 µl 70% ethanolu. DNA byla ještě dvakrát promyta 1,5 ml ethanolu. Nakonec byl ethanol odsán a zkumavka s DNA byla ponechána přes noc při laboratorní teplotě vyschnout. Druhý den bylo k DNA přidáno 200 µl PCR vody a změřena její koncentrace a čistota.

4.3.2 Izolace DNA z nativní tkáň

Izolace probíhala pomocí QuickGene DNA tissue kitu S. Nejprve byla ze zmrazeného vzorku odřezána sterilním skalpelem tkáň o velikosti asi 3x3 mm a vložena do sterilní zkumavky s ocelovými kuličkami. Tkáň byla homogenizována na přístroji SpeedMill. K homogenizované tkáni bylo přidáno 180 µl roztoku *MDT* a 20 µl *EDT*. Směs byla důkladně

vortexována a inkubována 1,5 hodiny při 59 °C. Poté bylo přidáno 180 µl roztoku *LDT* a opět vortexováno a inkubováno 10 min při 70 °C. Po inkubaci byla směs pulsně centrifugována.

Lyzát byl zpracován pomocí přístroje QuickGene-Mini80. Celý objem lyzátu byl přenesen do *cartridge* a filtrován za zvýšeného tlaku. Následně bylo do *cartridge* přidáno 750 µl *WDT* a opět filtrováno, a to celkem třikrát. Posledním krokem izolace byla eluce DNA zachycené na membráně přidáním 50 µl *CDT*. Byla změřena koncentrace a čistota izolované DNA.

4.3.3 Stanovení koncentrace DNA

Přístroj Nanodrop 2000c

Princip stanovení koncentrace spočívá v měření absorbance vzorku oproti referenčnímu prostředí – blanku, v našem případě PCR vody. Do prostoru průchodu paprsku se nanáší 1 µl referenčního roztoku, přístroj se nakalibruje na blank. Nanesený roztok se setře buničinou a dále se nanáší opět 1 µl roztoku vzorku a v softwaru se odečítá koncentrace, čistota a další parametry. Pro měření není třeba předchozí úpravy vzorku.

Přístroj Qubit

Stanovení je založeno na měření intenzity fluorescence. Nejprve byl připraven Qubit[®] pracovní roztok smícháním 199·*n* µl Qubit[®] reagentu a 1 · *n* µl Qubit[®] pufru, kde *n* značí počet měřených vzorků. Samotné vzorky byly připraveny smícháním 199 µl pracovního roztoku a 1 µl vzorku, následně vortexovány a inkubovány 2 minuty při laboratorní teplotě. Přístroj má již vnitřně kalibrovanou metodu pro stanovení koncentrace DNA, vzorky byly tedy přímo změřeny bez nutnosti předchozí kalibrace.

4.3.4 Gilbertův syndrom

Amplifikace pomocí PCR

Pro detekci inserce TA dinukleotidu v promotorové oblasti genu pro UDP-glukuronosyltransferázu 1A1 byla provedena nejprve amplifikace požadovaného úseku DNA metodou PCR za použití specifických primerů (Tabulka 5). Složení PCR směsi je uvedeno v tabulce 6, podmínky amplifikace v tabulce 7. Amplikon je v případě přítomnosti alely 6TA dlouhý 90 bp, u alely 7TA 92 bp.

Tabulka 5 - Sekvence primerů pro detekci Gilbertova syndromu [49]

primer F (5'--- 3')	ATT AAC TTG GTG TAT CGA TTG G
primer R (5'--- 3')	AGC CAT GGC GCC TTT GCT C

Tabulka 6 - Složení PCR směsi

	komponenta	V (µl)
1.	PCR voda	8,3
2.	2xMyTaq [™] HS mix	10
3.	primery F/R (10 pmol/µl)	1
4.	DNA templát	0,7
	výsledný objem	20

Tabulka 7 - Podmínky amplifikace

úvodní denaturace	5 cyklů			25 cyklů			závěrečná syntéza
95 °C 3 min	95 °C 20 s	55 °C 60 s	72 °C 20 s	95 °C 20 s	54 °C 30 s	72 °C 20 s	72 °C 3 min

Gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Amplifikované úseky DNA byly analyzovány vertikální elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Směs pro přípravu gelu je uvedena v tabulce 8.

Tabulka 8 – Směs pro přípravu 4% gelu pro elektroforetickou separaci DNA

	složka	objem
1.	destilovaná voda	35 ml
2.	TBE pufr (10x)	5 ml
3.	zásobní roztok (AA:BIS)	10 ml
4.	APS	150 µl
5.	TEMED	150 µl

Zásobní roztok: 40% roztok akrylamidu a N,N-methylenbisakrylamidu v poměru 19:1
TEMED: N,N,N',N'-tetrametyhlethylendiamin, APS: peroxodisíran amonný

PCR produkty byly v pipetovací destičce smíchány s nanášecím pufrem (8 µl vzorku + 2 µl nanášecího pufru) a následně naneseny na gel zalitý 1x koncentrovaným TBE pufrem. Elektroforéza probíhala při vkládaném napětí 700 V po dobu 80 minut. Gel byl po ukončení separace obarven v roztoku ethidiumbromidu a vizualizován pod UV světlem.

4.3.5 Sekvence promotorové oblasti genu UGT1A1

U vybraných kontrolních vzorků s genotypy 5/6, 5/7, 6/6, 6/8, 7/7, a 7/8 byla provedena analýza promotorové oblasti Sangerovým sekvenováním a verifikována tak metoda analýzy Gilbertova syndromu pomocí PCR a gelové elektroforézy. Nejprve byla namíchána a provedena amplifikace promotorové oblasti genu s použitím primerů, jejichž sekvenci uvádí tabulka 9 za podmínek uvedených v tabulce 10.

Tabulka 9 - Primery pro sekvenaci promotorové oblasti genu UGT1A1

primer	sekvence (5' --- 3')
F	CTGAAAGTGAAGTCCCTGCTA
R	CAAGAAGAATACAGTGGGCAGA

Tabulka 10 - Podmínky amplifikace

úvodní denaturace	10 cyklů			25 cyklů			závěrečná syntéza
95 °C 3 min	95 °C 20 s	64 °C 30 s	72 °C 40 s	95 °C 20 s	60 °C 30 s	72 °C 40 s	72 °C 3 min

Enzymové ošetření PCR produktu

Po ukončení amplifikace byl PCR produkt enzymaticky ošetřen směsí exonukleázy I (Exo) a alkalické fosfatázy (FastAP). Směs enzymů byla připravena smícháním zásobních roztoků enzymů v poměru Exo/FastAP 1:2. K 5 μ l PCR směsi bylo přidáno 1,5 μ l roztoku enzymů. Enzymová reakce probíhala za teploty 37 °C po dobu 15 minut a následně při teplotě 85 °C po dobu 15 minut.

Sekvenační PCR

Pro každý vzorek byly namíchány dvě sekvenační PCR směsi (primer F a R zvlášť). Složení směsi je uvedeno v tabulce 11.

Tabulka 11 - Složení sekvenační PCR směsi

	komponenta	V (μ l)
1.	PCR voda	2,7
2.	BigDye Terminator v3.1	0,5
3.	Sequencing buffer v3.1	0,5

Sekvenační PCR směs byla rozpipetována do jednotlivých zkumavek po 3,7 μ l. Bylo přidáno 0,5 μ l primeru F nebo R a 0,8 μ l PCR produktu po enzymatickém ošetření a spuštěn amplifikační program, jehož podmínky jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12 - Podmínky sekvenační PCR

úvodní denaturace	25 cyklů		
96 °C 1 min	96 °C 10 s	50 °C 5 s	60 °C 4 min

Následovalo přečištění sekvenační směsi pomocí magnetických kuliček na automatickém pipetovacím přístroji Biomek. Přečištěná směs byla sekvenována na přístroji Avant 3100. Elektroforegramy sekvenací jsou přílohou této práce.

4.3.6 Detekce delecí genů pro GSTM1 a GSTT1

Multiplex PCR

Vyšetření delecí genů kódujících glutathiontransferázy M1 a T1 proběhla multiplexovou PCR s následnou elektroforetickou detekcí PCR produktů ve 2% agarozovém gelu. Jako vnitřní kontrola amplifikace byl v reakci amplifikován gen pro β -globin. Sekvence primerů byly přejaty z článku a jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13 - Sekvence primerů a velikost amplikonů [50]

gen	primer F (5'--- 3')	primer R (5'--- 3')	amplikon
GSTM1	GAACCTCCCTGAAAAGCTAAAGC	CCTGGGCTCAAATATACGGTGG	219 bp
GSTT1	TTCCTTACTGGTCCCTCACATCTC	TCACCGGATCATGGCCAGCA	480 bp
β -globin	CAACCTCATCCACGTTCCACC	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	268 bp

Multiplexová PCR reakce probíhala za podmínek uvedených v tabulce 14. Směs pro multiplexovou reakci byla optimalizována navýšením koncentrace primerů pro gen GSTT1. Původní koncentrace pracovního roztoku primerů 10 pmol/μl byla navýšena na 15 pmol/μl. Po této úpravě již docházelo k dostatečné amplifikaci a produkt mohl být na gelu spolehlivě detekován.

Tabulka 14 - Podmínky multiplex PCR

úvodní denaturace	5 cyklů			25 cyklů			závěrečná syntéza
95 °C 3 min	95 °C 20 s	55 °C 60 s	72 °C 20 s	95 °C 20 s	55 °C 30 s	72 °C 20 s	72 °C 3 min

Agarózová gelová elektroforéza

Získané amplikony byly separovány vertikální elektroforézou ve 2% agarózovém gelu. Směs pro přípravu gelu je uvedena v tabulce 15. Vzorky byly smíchány s nanášecím pufrem (2 μl pufru + 8 μl vzorku) a naneseny na gel ponořený v 1x koncentrovaném TBE pufru. Elektroforéza probíhala za vloženého napětí 250 V po dobu 25 minut. Separované fragmenty byly detekovány pod UV světlem.

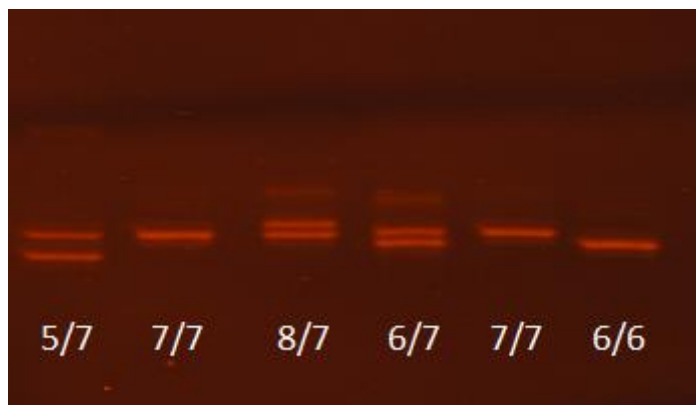
Tabulka 15 - Složky pro přípravu 2% agarózového gelu

	složka	množství
1.	destilovaná voda	270 ml
2.	TBE pufr (10x)	30 ml
3.	agaróza	6 g
4.	ethidium bromid (1%)	15 μl

5 VÝSLEDKY

5.1 Gilbertův syndrom

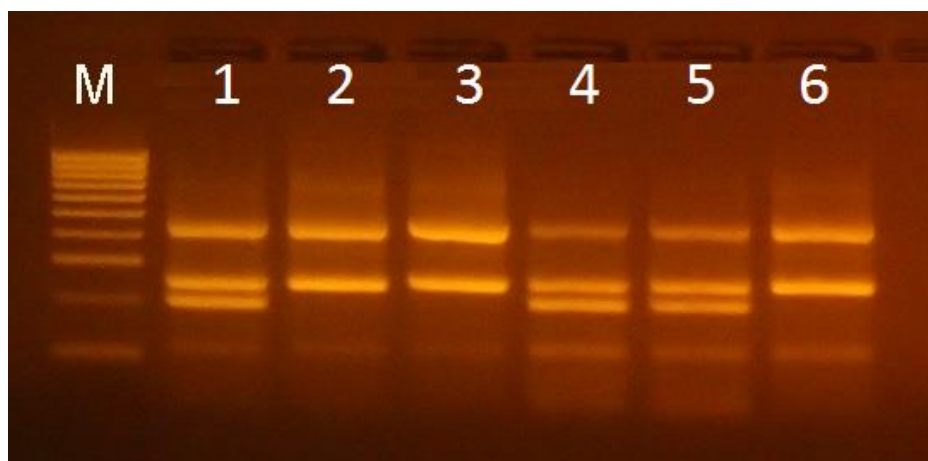
Promotorová oblast genu UGT1A1 byla analyzována konvenční PCR a gelovou elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Obrázek 11 znázorňuje analýzu promotorové oblasti genu UGT1A1 s příklady všech nalezených genotypů, elektroforegramy příslušných sekvenací jsou v příloze této práce.



Obrázek 11 - Analýza počtu TA dinukleotidů v promotorové oblasti genu UGT1A1 elektroforézou v polyakrylamidovém gelu

5.2 Null alely GSTM1 a GSTT1

Agarózovou gelovou elektroforézou byly analyzovány amplikony multiplexové reakce. Nejdelším fragmentem je amplikon genu pro GSTT1 (480 bp), kratším pak betaglobin (268 bp) a GSTM1 (219 bp). Obrázek 12 je uveden jako příklad vyhodnocení této metody. V dráze 1, 4 a 5 jsou přítomny alely pro gen GSTM1 i GSTT1 (GSTM1 pozitivní, GSTT1 pozitivní genotyp). V dráhách 2, 3 a 6 jsou přítomny pouze alely pro gen GSTT1 (GSTT1 pozitivní), gen GSTM1 zcela chybí (GSTM1 null). V dráze 4 a 5 pozorujeme přibližně poloviční fluorescenci amplikonu pro gen GSTT1 – lze usoudit, že se jedná o heterozygoty. Fenotyp heterozygota je však srovnatelný s fenotypem pozitivního homozygota, proto jsou tyto vzorky vyhodnoceny jako GSTT1 pozitivní.



Obrázek 12 - Analýza multiplex PCR null alel genů GSTM1 a GSTT1.

5.2.1 Frekvence polymorfismů v genech pro UGT1A1, GSTM1, GSTT1

Pro zhodnocení frekvence polymorfismu promotorové oblasti genu UGT1A1 (Gilbertova syndromu) byl použit test Hardy-Weinbergovy rovnováhy pro posouzení selekčního tlaku a test dobré shody (χ^2) pro zhodnocení rozdílu frekvence výskytu Gilbertova syndromu u nádorových a kontrolních skupin. Pro zhodnocení rozdílu frekvence výskytu null genotypu u kontrolních a nádorových skupin byl použit rovněž test dobré shody (χ^2). K výpočtu hodnot testového kritéria χ^2 byl použit online software [51]. Hladina statistické významnosti α byla zvolena 0,05. Výsledky testů jsou uvedeny u jednotlivých vyšetřovaných skupin.

Test Hardy-Weinbergovy rovnováhy:

Pro výpočet genetické rovnováhy byly u všech skupin brány v úvahu pouze genotypy 6TA/6TA, 6TA/7TA a 7TA/7TA. Zbylé genotypy byly minoritní a na statistické zhodnocení výsledků neměly vliv. Příklad výpočtu vychází z dat kontrolní skupiny I.

Výpočet očekávané frekvence:

$$6TA/6TA = p^2 \rightarrow p = \frac{2 \cdot 6TA/6TA + 6TA/7TA}{3\ 374} = 0,607 \rightarrow p^2 = 0,37$$

$$7TA/7TA = q^2 \rightarrow q = \frac{2 \cdot 7TA/7TA + 6TA/7TA}{3\ 374} = 0,393 \rightarrow q^2 = 0,15$$

$$6TA/7TA = 2pq \rightarrow 2pq = 2 \cdot 0,607 \cdot 0,393 = 0,48$$

Z očekávaných frekvencí byly dopočítány počty očekávaných genotypů za genetické rovnováhy. Chí kvadrát testem bylo ověřeno, zda je rozdíl mezi experimentálním a očekávaným počtem genotypů.

Výpočet χ^2 :

$$\chi^2 = \frac{(n_e - n_o)^2}{n_o} = \frac{(634 - 621)^2}{621} = 0,25$$

Hladina statistické významnosti α byla zvolena 0,05. Stupeň volnosti určen jako 1: počet sledovaných genotypových tříd mínus 1, mínus počet parametrů odhadovaných z údajů (parametr p). Kritická hodnota χ^2_{krit} je za těchto podmínek rovna 3,841.

Suma χ^2 hodnot pro jednotlivé genotypy v kontrolní skupině I činí 1,611 a je menší než hodnota χ^2_{krit} . Na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$ tedy platí tvrzení, že se populace nachází v genetické rovnováze. V tabulce 17 jsou uvedeny všechny vypočítané hodnoty pro kontrolní skupinu I. U dalších skupin jsou uvedeny pouze výsledky hodnoty χ^2 a zhodnocení genetické rovnováhy.

5.2.1.1 Obecná kontrolní skupina (KS I)

Frekvence výskytu Gilbertova syndromu byla sledována na populaci čítající 1 701 jedinců z české a slovenské republiky. Výsledky ukazují 16% výskyt Gilbertova syndromu, což je poněkud více než uvádí dostupná literatura. Obecně se výskyt Gilbertova syndromu v evropské populaci uvádí kolem 5-10 %, některé studie uvádějí i více, maximálně však 15 %. Protože není Gilbertův syndrom spojován s žádným patologickým stavem, není jeho přesná frekvence v populaci dostatečně monitorována. Uvádí se, že jedna třetina postižených jedinců neví, že mají Gilbertův syndrom, což může vysvětlit tento malý rozdíl mezi frekvencí udávanou v literatuře a frekvencí zjištěnou v této studii. Ostatní genotypové frekvence

promotorové oblasti genu UGT1A1 jsou uvedeny v tabulce 16. Frekvence alely 7TA je dle této studie 34,9 %, což odpovídá hodnotám v literatuře. [2] [52]

Tabulka 16 - Frekvence polymorfismu promotorové oblasti genu UGT1A1 kontrolní skupiny I

genotyp	počet	[%]
6/6	634	37,3
6/7	780	45,9
7/7	273	16,0
5/6	7	0,4
7/8	3	0,2
5/7	4	0,2
celkem	1 701	≈100

Hardy-Weinbergův princip říká, že frekvence alel a genotypů jsou za jistých podmínek předpověditelné. Ve velké populaci náhodně se křížících jedinců zůstávají frekvence alel a genotypů zachovány (mendelovská dědičnost nemění frekvenci alel). Genotypové a tím i alelické frekvence se však mohou měnit působením evolučních sil (selekce, migrace či mutace). Výsledky testu Hardy-Weinbergovy rovnováhy u kontrolní skupiny I působení selekčního tlaku vůči sledovaným alelám neprokazují.

Tabulka 17 - Test Hardy-Weinbergovy (genetické) rovnováhy pro kontrolní skupinu I

genotyp	experimentální počet (n_e)	očekávaná frekvence	očekávaný počet (n_o)	χ^2	H-W rovnováha
6/6 (p^2)	634	0,37	621	0,25	ANO
6/7 ($2pq$)	780	0,15	805	0,77	
7/7 (q^2)	273	0,48	261	0,59	
Σ	1687	1	1687	1,611	$\chi^2 < \chi^2_{krit}$ 1,611 < 3,841

Frekvence null genotypu GSTM1 je v kontrolní skupině ve shodě s literárními údaji. Null genotyp pro GSTT1 však nebyl pozorován u žádného jedince této kontrolní skupiny, přestože literatura uvádí průměrné frekvence mezi 15-25 %.

Tabulka 18 - Frekvence null genotypu GSTM1 a GSTT1 u kontrolní skupiny I

genotyp	GSTM		GSTT	
	počet	[%]	počet	[%]
null	122	50,4	0	0
pozitivní	120	49,6	242	100
celkem	242	100	242	100

5.2.1.2 Speciální kontrolní skupina (KS II)

Speciální kontrolní skupina je tvořena jedinci staršími šedesáti let, kteří neprodělali nádorové onemocnění a to se nevyskytlo ani u jejich nejbližších příbuzných (sourozenců, rodičů a dětí). Podle hypotézy, kterou se tato práce snaží testovat, by frekvence Gilbertova syndromu jako protektivního faktoru mohla být o něco vyšší než u kontrolní skupiny I a statisticky významně vyšší než u nádorových skupin. Naopak frekvence null genotypu GSTM1 i GSTT1 by měla být nižší oproti nádorovým skupinám. Statisticky významné rozdíly však mezi kontrolní skupinou I a II ani u jednoho z testovaných genů pozorovány nebyly. Frekvence Gilbertova syndromu u speciální kontrolní skupiny byla naopak ještě o 0,6 % nižší než u kontrolní skupiny I. Zároveň i frekvence null genotypu GSTM1 u speciální kontrolní skupiny byla vyšší, což neodpovídá naší hypotéze, která považuje homozygotní delecii GSTM1 za rizikový faktor. Co se týče frekvence null alel genu pro GSTT1, nebyl rovněž pozorován žádný případ stejně jako u kontrolní skupiny I. Konkrétní frekvence genotypů jsou uvedeny v tabulce níže.

Tabulka 19 - Frekvence polymorfismu promotorové oblasti genu UGT1A1 u kontrolní skupiny II a statistické zhodnocení

genotyp	počet	[%]	H-W rovnováha	odlišnost od KS I
6/6	90	39,5	ANO	NE
6/7	102	44,7		
7/7	35	15,4	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 0,465 < 3,841	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 0,372 < 5,991
5/7	1	0,4		
celkem	228	≈100		

Tabulka 20 - Frekvence null genotypu GSTM1 a GSTT1 u kontrolní skupiny II a statistické zhodnocení

genotyp	GSTM1		GSTT1	
	počet	[%]	počet	[%]
null	126	55,3	0	0
pozitivní	102	44,7	228	100
celkem	228	100	228	100
odlišnost od KS I	NE		NE	
	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 1,107 < 3,841		$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 0 < 3,841	

5.2.1.3 Kolorektální karcinom

První a zároveň největší nádorovou skupinou, na které byla hypotéza protektivních a rizikových faktorů spojených s polymorfismy genů pro biotransformační enzymy testována, byli pacienti s kolorektálním karcinomem. Gilbertův syndrom byl zaznamenán sice v nižší frekvenci než tomu bylo u obou kontrolních skupin, a to ve 12,5 % případů, rozdíl 3,5 % oproti KS I a 2,9 % oproti KS II však není statisticky významný. Teorii o protektivním účinku bilirubinu proti vzniku kolorektálního karcinomu tak touto prací podpořit nelze.

Tabulka 21 - Frekvence polymorfismu promotorové oblasti genu UGT1A1 u pacientů s kolorektálním karcinomem a statistické zhodnocení

genotyp	počet	[%]	H-W rovnováha	odlišnost od KS I	odlišnost od KS II
6/6	170	42,4	ANO	NE	NE
6/7	179	44,6			
7/7	50	12,5	$\chi^2 < \chi^2_{krit}$ $0,073 < 3,841$	$\chi^2 < \chi^2_{krit}$ $5,022 < 5,991$	$\chi^2 < \chi^2_{krit}$ $1,194 < 5,991$
5/6	1	0,2			
7/8	1	0,2			
celkem	401	≈100			

Statisticky významný rozdíl byl však pozorován u null genotypu GSTT1. Zatímco pozorovaná frekvence null genotypu u pacientů s tímto typem nádoru je 9,7 %, v obou kontrolních skupinách se nevyskytl null genotyp vůbec. GSTM1 null genotyp byl pozorován prakticky se stejnou frekvencí jako u kontrolní skupiny I.

Tabulka 22 - Frekvence null genotypu GSTM1 a GSTT1 u pacientů s kolorektálním karcinomem a statistické zhodnocení

genotyp	GSTM1		GSTT1	
	počet	[%]	počet	[%]
null	198	49,4	39	9,7
pozitivní	203	50,6	362	90,3
celkem	401	100	228	100
odlišnost od KS I	NE		ANO	
	$\chi^2 < \chi^2_{krit}$ $0,065 < 3,841$		$\chi^2 > \chi^2_{krit}$ $133,1 > 3,841$	
odlišnost od KS II	NE		ANO	
	$\chi^2 < \chi^2_{krit}$ $2,018 < 3,841$		$\chi^2 > \chi^2_{krit}$ $23,649 > 3,841$	

5.2.1.4 Karcinom pankreatu

Srovnáním frekvencí Gilbertova syndromu u pacientů s karcinomem pankreatu a kontrolními skupinami byl na hladině statistické významnosti 0,05 zjištěn rozdíl. Frekvence genotypu 7TA/7TA byla u této nádorové skupiny 11,1 %, tedy o téměř 5 % nižší než u kontrolní skupiny I. Pro silnější potvrzení hypotézy protektivního účinku by bylo třeba provést vyšetření u větší skupiny pacientů popřípadě srovnat výsledky s dalšími podobnými studiemi. Bohužel ale doposud nebyla nalezena podobná studie, která by se zabývala protektivním účinkem Gilbertova syndromu v souvislosti s karcinomem pankreatu.

Tabulka 23 - Frekvence polymorfismu promotorové oblasti genu UGT1A1 u pacientů s karcinomem pankreatu a statistické zhodnocení

genotyp	počet	[%]	H-W rovnováha	odlišnost od KS I	odlišnost od KS II
6/6	74	54,8	ANO	ANO	ANO
6/7	46	34,1			
7/7	15	11,1	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$	$\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$	$\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$
celkem	135	≈100	0,073 < 3,841	15,664 > 5,991	7,878 > 5,991

Frekvence null genotypu GSTM1 byla oproti očekáváním statisticky významně nižší u pacientů s karcinomem pankreatu než u obou kontrolních skupin. Lze tak usoudit, že deficiencie studovaných glutathion S-transferáz nehraje zásadní roli při rozvoji tohoto druhu onemocnění. Tyto výsledky jsou ve shodě se studií provedenou G. Liu a spol., kteří také neprokázali vyšší výskyt null genotypu u pacientů s karcinomem pankreatu. Právě tyto biotransformační enzymy tak pravděpodobně nehrají klíčovou roli v metabolismu kancerogenních látek majících genotoxických efekt na buňky pankreatu nebo jejich deficiencie není sama o sobě dostačující k podpoře nádorové transformace a pro rozvoj onemocnění jsou vyžadovány další environmentální faktory. [53]

Tabulka 24 - Frekvence null genotypu GSTM1 a GSTT1 u pacientů s karcinomem pankreatu a statistické zhodnocení

genotyp	GSTM1		GSTT1	
	počet	[%]	počet	[%]
null	53	39,3	4	3,0
pozitivní	82	60,7	131	97,0
celkem	135	100	135	100
odlišnost od KS I	ANO		ANO	
	$\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ 4,338 > 3,841		$\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ 7,266 > 3,841	
odlišnost od KS II	ANO		ANO	
	$\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ 8,688 > 3,841		$\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ 6,813 > 3,841	

5.2.1.5 Karcinom prsu

Gilbertův syndrom a riziko vzniku karcinomu prsu je ambivalentní. Pokud bereme v úvahu bilirubin jako silný antioxidační mechanismus bránící oxidativnímu poškození buněk, je Gilbertův syndrom protektivním faktorem proti vzniku karcinomu. Pokud bychom se ale zaměřili na substrátovou specifitu UDP-glukuronosyl transferázy 1A1, zjistíme, že se účastní také metabolismu estrogenu. Ten sice hraje v metabolismu žen klíčovou roli, jeho zvýšená hladina je ale asociována se zvýšeným rizikem karcinomu prsu. Pokud je žena nositelkou Gilbertova syndromu, aktivita její UDP-glukuronosyl transferázy 1A1 je nižší a dochází k pomalejšímu metabolismu estrogenu. Zda je tedy Gilbertův syndrom protektivním nebo naopak rizikovým faktorem pro vznik karcinomu prsu bylo předmětem mnoha studií, jejichž

výsledky jsou ale bohužel diskrepantní. Z našich výsledků vyplývá, že je Gilbertův syndrom protektivním faktorem, jeho výskyt je totiž u kontrolní populace o 5 % vyšší, než je tomu u pacientek s nádorem prsu. Oproti kontrolní skupině II statisticky významný rozdíl pozorován nebyl. [38]

Tabulka 25 - Frekvence polymorfismu promotorové oblasti genu UGT1A1 u pacientek s karcinomem prsu a statistické zhodnocení

genotyp	počet	[%]	H-W rovnováha	odlišnost od KS I	odlišnost od KS II
6/6	119	43,9	ANO	ANO	NE
6/7	125	46,1			
7/7	27	10,0	$\chi^2 < \chi^2_{krit}$	$\chi^2 > \chi^2_{krit}$	$\chi^2 < \chi^2_{krit}$
celkem	271	≈100	0,494 < 3,841	8,327 > 5,991	3,528 < 5,991

Výskyt null genotypu GSTM1 je u pacientek s karcinomem prsu srovnatelný jako u kontrolní skupiny I, oproti kontrolní skupině II je nižší, rozdíl však není statisticky významný. Studie, s nimiž byly tyto výsledky srovnány, rovněž nenašly asociaci mezi null genotypy GSTM1 ani GSTT1 a zvýšeným rizikem rakoviny nebo byla asociace slabá, statisticky nevýznamná. [19] [54] [55]

Tabulka 26 - Frekvence null genotypu GSTM1 a GSTT1 u pacientek s karcinomem prsu a statistické zhodnocení

genotyp	GSTM1		GSTT1	
	počet	[%]	počet	[%]
null	146	50,4	1	0,4
pozitivní	125	49,6	270	99,6
celkem	271	100	271	100
odlišnost od KS I	NE		NE	
	$\chi^2 < \chi^2_{krit}$ 0,613 < 3,841		$\chi^2 < \chi^2_{krit}$ 0,889 < 3,841	
odlišnost od KS II	NE		NE	
	$\chi^2 < \chi^2_{krit}$ 0,096 < 3,841		$\chi^2 < \chi^2_{krit}$ 0,854 < 3,841	

5.2.1.6 Karcinom prostaty

Frekvence Gilbertova syndromu u pacientů s karcinomem prostaty je opět nižší než u obou kontrolních skupin, ne však statisticky významně. Studie publikovaná v časopise *Cancer Epidemiology* došla ke stejnému závěru, tedy že polymorfismus promotorové oblasti genu UGT1A1 (genotyp 7TA/7TA) nepůsobí jako protektivní faktor proti vzniku nádorů prostaty. Jiné studie zaměřené na hladinu bilirubinu v krvi nádorových pacientů došly k závěru, že vyšší hladina bilirubinu vede k lepší prognóze podobně jako je tomu u nádorů prsu. Protektivní účinek proti samotnému vzniku onemocnění ale není dostatečně přesvědčující. [30] [56]

Tabulka 27 - Frekvence polymorfismu promotorové oblasti genu UGT1A1 u pacientů s karcinomem prostaty a statistické zhodnocení

genotyp	počet	[%]	H-W rovnováha	odlišnost od KS I	odlišnost od KS II
6/6	67	39,2	ANO	NE	NE
6/7	82	48,0			
7/7	21	12,3	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 0,494 < 3,841	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 1,699 < 5,991	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 0,878 < 5,991
5/7	1	0,6			
celkem	171	≈100			

Frekvence null genotypu GSTM1 byla u této nádorové skupiny vyšší než u obou kontrolních skupin. Rozdíl však ani v jednom případě nebyl statisticky významný. GSTT1 null genotyp byl nalezen pouze v jednom případě. Null genotyp GSTM1 ani GSTT1 tedy v případě vzniku karcinomu prostaty nehraje významnou roli. Tyto výsledky jsou ve shodě s meta studií, která analyzovala celkem 36 studií (přes 6 tisíc případů karcinomu prostaty) a v Kavkazské populaci nenašla asociaci mezi null genotypem a zvýšeným rizikem tohoto karcinomu. [57]

Tabulka 28 - Frekvence null genotypu GSTM1 a GSTT1 u pacientů s karcinomem prostaty a statistické zhodnocení

genotyp	GSTM1		GSTT1	
	počet	[%]	počet	[%]
null	98	57,3	1	0,6
pozitivní	73	42,7	170	99,4
celkem	171	100	171	100
odlišnost od KS I	NE		NE	
	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 1,914 < 3,841		$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 1,433 < 3,841	
odlišnost od KS II	NE		NE	
	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 0,166 < 3,841		$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 1,329 < 3,841	

5.2.1.7 Karcinom plic

Frekvence Gilbertova syndromu u pacientů s karcinomem plic je nižší než u kontrolní skupiny, ne však statisticky významně. Tato nádorová skupina je však relativně malá a pro větší statistickou sílu dat by bylo třeba provést vyšetření na větší skupině.

Tabulka 29 - Frekvence polymorfismu promotorové oblasti genu *UGT1A1* u pacientů s karcinomem plic a statistické zhodnocení

genotyp	počet	[%]	H-W rovnováha	odlišnost od KS I	odlišnost od KS II
6/6	35	35,4	ANO	NE	NE
6/7	52	52,5			
7/7	12	12,1	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$
celkem	99	≈100	1,207 < 3,841	1,885 < 5,991	1,690 < 5,991

Zatímco frekvence null genotypu *GSTM1* je u této nádorové skupiny statisticky významně nižší než u kontrolních skupin, frekvence *GSTT1* je naopak statisticky významně vyšší. Zároveň je ze všech nádorových skupin zahrnutých v této práci frekvence *GSTT1* null genotypu vůbec nejvyšší, a to 17,2 %. Lze tak usuzovat, že deficiencie glutathion S-transferázy T1 je rizikovým faktorem pro vznik karcinomu plic. Stejný výsledek přinesla například také analýza dánských vědců, která prokázala rovněž vyšší riziko vzniku karcinomu plic u nositelů genotypu *GSTT1* null a nezměněné riziko u *GSTM1* null genotypu. [58]

Tabulka 30 - Frekvence null genotypu *GSTM1* a *GSTT1* u pacientů s karcinomem plic a statistické zhodnocení

genotyp	GSTM1		GSTT1	
	počet	[%]	počet	[%]
null	37	27,4	17	17,2
pozitivní	62	62,6	82	82,8
celkem	99	100	99	100
odlišnost od KS I	ANO		ANO	
	$\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ 4,799 > 3,841		$\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ 43,7 > 3,841	
odlišnost od KS II	ANO		ANO	
	$\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ 8,838 > 3,841		$\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ 41,2 > 3,841	

5.2.1.8 Karcinom hlavy a krku

Gilbertův syndrom je u pacientů s nádory hlavy a krku nejčastější ve srovnání s ostatními nádorovými skupinami, frekvence výskytu však stále nižší než u obou kontrolních skupin. Vznik těchto karcinomů je často spojen s infekcí lidským papilomavirem (HPV), Gilbertův syndrom jakožto protektivní faktor tak nemůže hrát významnější roli. Zároveň je třeba zmínit, že tato nádorová skupina je relativně malá pro tvorbu významnějších závěrů.

Tabulka 31 - Frekvence polymorfismu promotorové oblasti genu UGT1A1 u pacientů s karcinomem hlavy a krku a statistické zhodnocení

genotyp	počet	[%]	H-W rovnováha	odlišnost od KS I	odlišnost od KS II
6/6	18	40,9	ANO	NE	NE
6/7	20	45,5			
7/7	6	13,6	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$
celkem	44	≈100	0,014 < 3,841	0,304 < 5,991	0,095 < 5,991

Frekvence null genotypu GSTM1 u pacientů s nádory hlavy a krku je nižší než u obou kontrolních skupin. Frekvence GSTT1 null je naopak druhou nejvyšší pozorovanou mezi všemi nádorovými skupinami. Pokud výsledky této práce srovnáme s větší studií provedenou na 162 pacientech a 315 kontrolách, zjistíme, že se práce shodují v předpokladu GSTT1 null genotypu jako rizikového faktoru. Null genotyp GSTM1 je ale podle zmíněné studie rovněž rizikovým faktorem, což tato práce nepotvrzuje. Je ale znovu třeba podotknout, že tato nádorová skupina je relativně malá a bylo by vhodné pro vyvození dalších závěrů počet vzorků navýšit. [48]

Tabulka 32 - Frekvence null genotypu GSTM1 a GSTT1 u pacientů s karcinomem hlavy a krku a statistické zhodnocení

genotyp	GSTM1		GSTT1	
	počet	[%]	počet	[%]
null	20	45,5	7	15,9
pozitivní	24	54,5	37	84,1
celkem	44	100	44	100
odlišnost od KS I	NE		ANO	
	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 0,368 < 3,841		$\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ 39,3 > 3,841	
odlišnost od KS II	NE		ANO	
	$\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ 1,429 < 3,841		$\chi^2 > \chi^2_{\text{krit}}$ 37,3 > 3,841	

5.2.2 Souhrnné výsledky pro gen UGT1A1

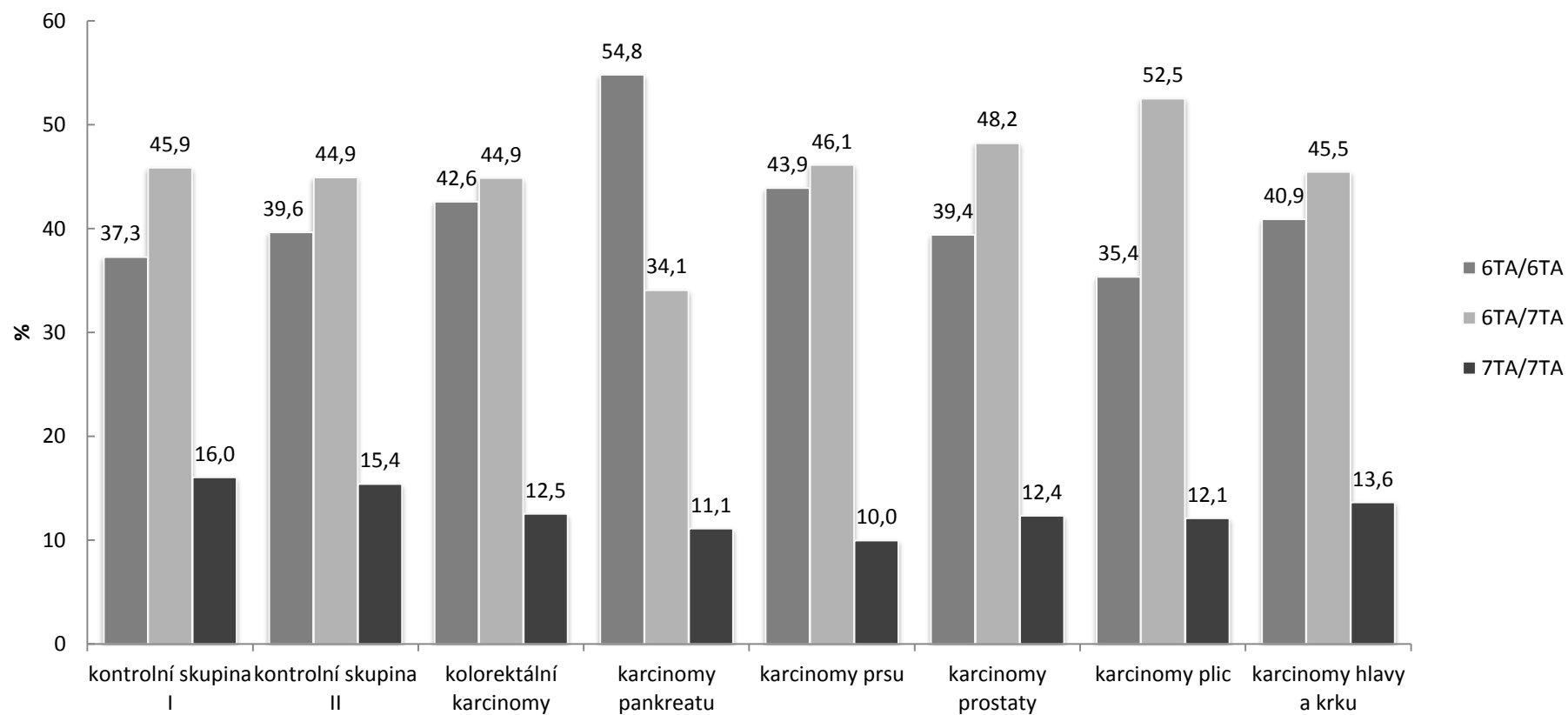
Souhrnné výsledky frekvence Gilbertova syndromu pro všechny nádorové a kontrolní skupiny jsou uvedeny v tabulce 33 a rovněž graficky vyjádřeny na obrázku 13. Frekvence sledovaných alel 6TA a 7TA jsou u všech skupin v Hardy-Weinbergově rovnováze. Lze tak vyloučit působení selekčního tlaku vůči alele 6TA. Hypotéza, kterou se tato práce snaží ověřit, totiž považuje alelu 7TA za protektivní, která v homozygotním genotypu zvyšuje hladinu bilirubinu v krvi a tím chrání organismus před vlivem oxidačního stresu různého původu. Dal by se tak očekávat větší výskyt frekvence této alely oproti alele 6TA. Jedním z možných vysvětlení, proč tomu tak není, je, že nádorová onemocnění, na jejichž vzniku se podílí oxidační stres, se projevují až v postreprodukčním věku (hromadění chyb je postupný

proces). Selekcční tlak vůči jedincům s genotypem 6TA/6TA se tedy projeví až po předání genofondu další generaci.

Výsledky ukazují, že deficiencie protektivního efektu vyšší hladiny bilirubinu způsobené sníženou expresí enzymu zajišťujícího jeho vyloučení, se projevuje u dvou nádorových skupin – pacientů s karcinomy prsu a pankreatu. U obou těchto skupiny je výskyt Gilbertova syndromu statisticky významně nižší než u kontrolní skupiny I. U pacientů s karcinomem pankreatu je frekvence Gilbertova syndromu nižší také oproti kontrolní skupině II. Kontrolní skupina II je speciální skupinou, u níž byla frekvence Gilbertova syndromu očekávána ještě vyšší než u běžné kontrolní populace. Jedná se totiž o zdravé jedince, u kterých se ani v nejbližší rodině nevyskytlo žádné nádorové onemocnění. Toto očekávání se však nenaplnilo a frekvence Gilbertova syndromu byla v této skupině téměř srovnatelná s kontrolní skupinou I. U ostatních nádorových skupiny byla sice frekvence Gilbertova syndromu vždy nižší než u obou kontrolních skupin, ne však statisticky významně.

Tabulka 33 - Souhrnné výsledky analýzy promotorové oblasti genu *UGT1A1*

	kontrolní skupina I	kontrolní skupina II	kolorektální karcinomy	karcinomy pankreatu	karcinomy prsu	karcinomy prostaty	karcinomy plic	karcinomy hlavy a krku
6TA/6TA	634 (37,3 %)	90 (39,5 %)	170 (42,6 %)	74 (54,8 %)	119 (43,9 %)	67 (39,2 %)	35 (35,4 %)	18 (40,9 %)
6TA/7TA	780 (45,9 %)	102 (44,7 %)	179 (44,9 %)	46 (34,1 %)	125 (46,1 %)	82 (48,0 %)	52 (52,5 %)	20 (45,5 %)
7TA/7TA	273 (16,0 %)	35 (15,4 %)	50 (12,5 %)	15 (11,1 %)	27 (10,0 %)	21 (12,3 %)	12 (12,1 %)	6 (13,6 %)
celkem	1687	228	399	135	271	170	99	44
H-W rovnováha	ANO - rozložení genotypů ve všech skupinách se nachází v genetické rovnováze							
odlišnost od KS I	—	NE	NE	ANO	ANO	NE	NE	NE
odlišnost od KS II	NE	—	NE	ANO	NE	NE	NE	NE



Obrázek 13 - Graf frekvencí výskytu sekvenčních variant promotorové oblasti genu UGT1A1

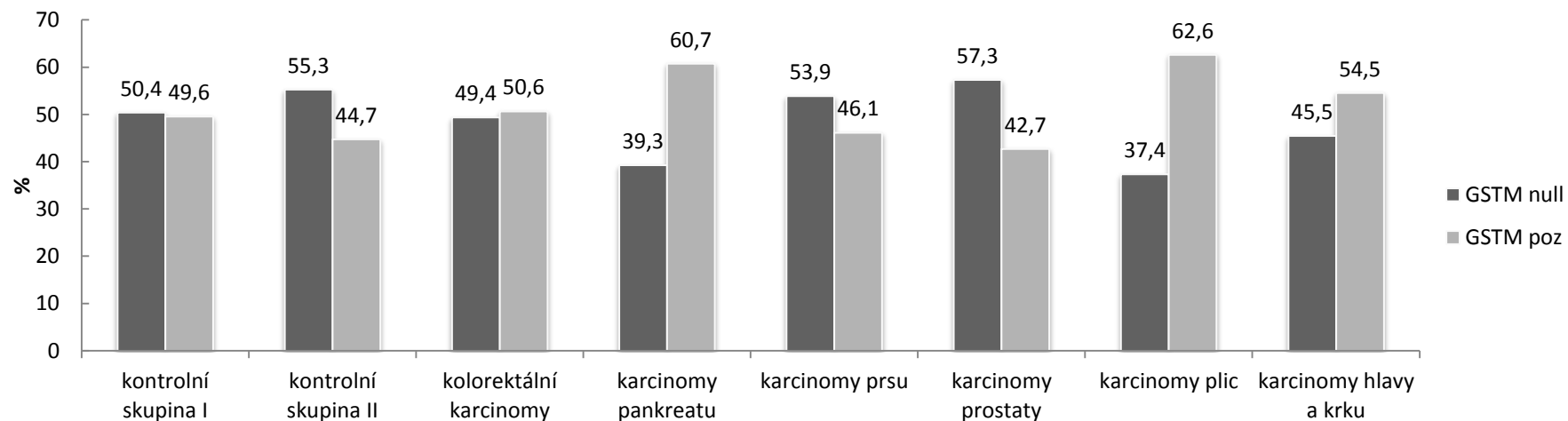
5.2.3 Souhrnné výsledky pro null genotypy GSTM1 a GSTT1

Frekvence výskytu null genotypu GSTM1 u kontrolní skupiny I se shoduje s údaji udávanými v literatuře (50 %). O necelých 5 % vyšší frekvence byla oproti očekávání pozorována u kontrolní skupiny II. U žádné z nádorových skupin však nebyl zaznamenán výrazně vyšší výskyt null genotypu GSTM1 oproti kontrolním skupinám. Nejvyšší výskyt tohoto polymorfismu byl sledován u pacientů s nádorem prostaty (57,3 %), statisticky významný však tento výsledek není. Naopak u pacientů s nádory pankreatu a plic byla frekvence výskytu null genotypu oproti kontrolním skupinám statisticky významně nižší, což zcela rozporuje očekávání – tyto případy jsou v tabulce 34 označeny symbolem hvězdičky.

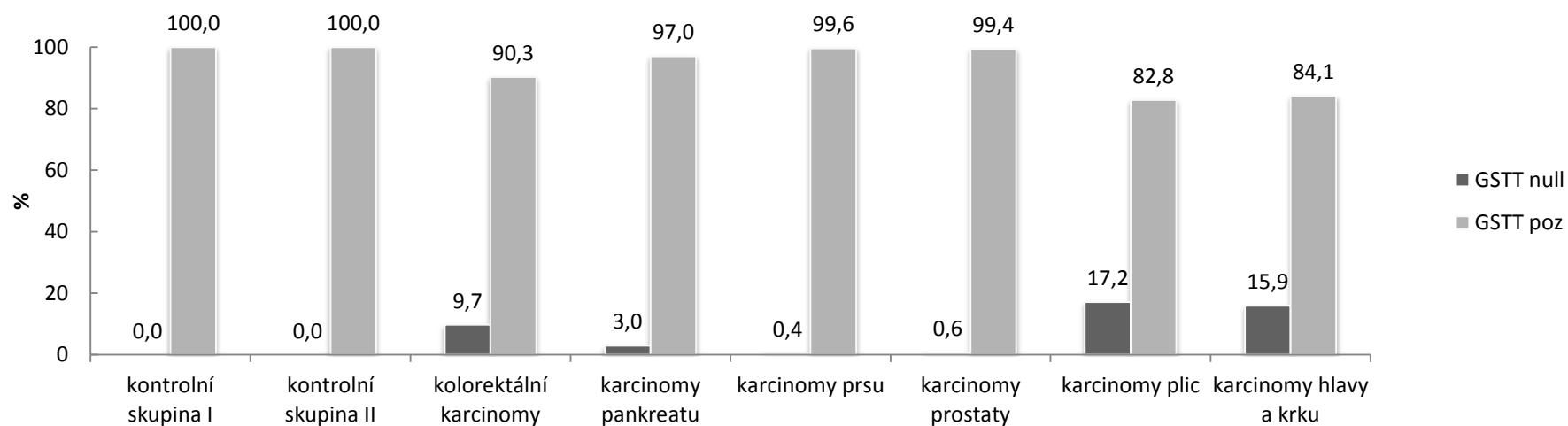
Již v průběhu měření byla pozorována vysoká frekvence pozitivních GSTT1 genotypů. V obou kontrolních skupinách nebyl identifikován ani jeden nositel null genotypu GSTT1. U pacientů s nádory prostaty a prsu byl null genotyp identifikován v obou skupinách pouze jednou. Signifikantně vyšší počet tohoto polymorfismu byl ale pozorován u pacientů s kolorektálním karcinomem (9,7 %), karcinomem pankreatu (3,0 %), karcinomem hlavy a krku (15,9 %) a s nejvyšší frekvencí u pacientů s plicním karcinomem (17,2 %). U skupin s karcinomy hlavy a krku, kolorektálního a plicního karcinomu tak můžeme hovořit o null genotypu GSTT1 jako o rizikovém faktoru.

Tabulka 34 - Souhrnné výsledky analýzy null genotypu genů GSTM1 a GSTT1

		kontrolní skupina I	kontrolní skupina II	kolorektální karcinomy	karcinomy pankreatu	karcinomy prsu	karcinomy prostaty	karcinomy plic	karcinomy hlavy a krku
GSTM1	null	122 (50,4 %)	126 (55,3 %)	198 (49,4 %)	53 (39,3 %)	146 (53,9 %)	98 (57,3 %)	37 (37,4 %)	20 (45,5 %)
	poz	120 (49,6 %)	102 (44,7 %)	203 (50,6 %)	82 (60,7 %)	125 (46,1)	73 (42,7 %)	62 (62,6 %)	24 (54,5 %)
	odlišnost od KS I	–	NE	NE	ANO *	NE	NE	ANO *	NE
	odlišnost od KS II	NE	–	NE	ANO *	NE	NE	ANO *	NE
GSTT1	null	0 (0 %)	0 (0 %)	39 (9,7 %)	4 (3,0 %)	1 (0,4 %)	1 (0,6 %)	17 (17,2 %)	7 (15,9 %)
	poz	242 (100 %)	228 (100 %)	362 (90,3 %)	131 (97,8 %)	270 (99,6 %)	170 (99,4 %)	82 (82,8 %)	37 (84,1 %)
	odlišnost od KS I	–	NE	ANO	ANO	NE	NE	ANO	ANO
	odlišnost od KS II	NE	–	ANO	ANO	NE	NE	ANO	ANO



Obrázek 14 - Graf frekvencí výskytu null genotypu genu *GSTM1*



Obrázek 15 - Graf frekvencí výskytu null genotypu genu *GSTT1*

6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo porovnat výskyt polymorfismů genů UDP-glukuronosyl transferázy 1A1 a glutathion S-transferáz M1 a T1. Všechny tři geny jsou důležitou součástí druhé fáze metabolismu xenobiotik. Polymorfismem sledovaným u UGT1A1 byla sekvenční varianta promotorové oblasti tohoto genu. Pomocí standardní PCR a elektroforézy v polyakrylamidovém gelu byl analyzován počet TA repetice v sekvenci TATA boxu. Homozygotní jedinci pro alelu 7TA mají tzv. Gilbertův syndrom, který způsobuje zvýšenou hladinu bilirubinu v krvi. Vzhledem k antioxidačním vlastnostem bilirubinu se předpokládá, že jedinci s Gilbertovým syndromem jsou zvýšenou hladinou bilirubinu chráněni proti nadměrnému oxidačnímu stresu a následně i proti tvorbě mutací v DNA a vzniku nádorů. Frekvence výskytu Gilbertova syndromu by tedy mohla být u nádorových pacientů významně nižší než u zdravých kontrol. Tato hypotéza se z celkových šesti prověřovaných nádorových skupin potvrdila pouze u dvou. U skupiny pacientů s karcinomem prsu, která čítala celkem 271 jedinců, byla frekvence výskytu Gilbertova syndromu 10,0 %, u pacientů s nádorem pankreatu se 135 testovanými jedinci pak 11,1 %. Tyto hodnoty jsou statisticky významně odlišné od hodnot naměřených v kontrolní skupině I, kde frekvence Gilbertova syndromu činila 16,0 %. U ostatních nádorových skupin, kterými byli pacienti s kolorektálním karcinomem, karcinomem plic, prostaty a karcinomem hlavy a krku byla sice frekvence také nižší, ale nikoliv statisticky významně odlišná. Protektivní účinek proti těmto typům karcinomů tak vyvozen být nemůže.

Druhými dvěma sledovanými polymorfismy byly null genotypy genů pro GSTM1 a GSTT1. Jedinci nesoucí delece obou alel těchto genů jsou deficientní pro příslušný enzym. Vzhledem k tomu, že se tyto enzymy účastní eliminace důležitých škodlivých látek z těla, je ztráta jejich aktivity spojována s vyšším rizikem poškození buněk a z toho plynoucí možnosti jejich nádorové transformace. Multiplexovou PCR s elektroforetickou analýzou v agarózovém gelu byly vyšetřeny null genotypy těchto genů u stejných nádorových skupin, jako tomu bylo u genu UGT1A1, a u kontrolních skupin.

U genu pro GSTM1 byl navzdory očekávání pozorován statisticky významně nižší výskyt null genotypu u pacientů s karcinomy plic (37,4 %) a pankreatu (39,3 %) oproti kontrolní skupině I, kde byla frekvence null genotypu 50,4 % a také oproti kontrolní skupině II s frekvencí null genotypu 55,3 %. Deficience glutathion S-transferázy M1 se tak nezdá být rizikovým faktorem pro tyto typy karcinomů. U ostatních nádorových skupin byly frekvence srovnatelné, statisticky se nelišící od kontrolních skupin.

Null genotyp genu pro GSTT1 nebyl u kontrolní populace vůbec pozorován. Podobně tomu bylo i u pacientů s nádory prostaty a prsu, kde byl null genotyp u obou skupin pozorován pouze v jednom případě. Naopak signifikantně vysoká frekvence null genotypu GSTT1 se vyskytla u skupiny s karcinomem plic (17,2 %), karcinomem hlavy a krku (15,9 %), kolorektálním karcinomem (9,7 %) a karcinomem pankreatu (3 %). Deficience enzymu glutathion S-transferázy T1 se tak pro vznik těchto nádorů jeví jako rizikový faktor.

Pro podpoření výše zmíněných závěrů by však bylo potřeba ještě rozšířit jednotlivé vyšetřované skupiny (zejména skupiny s nádory hlavy a krku, pankreatu a plic) a zjistit doplňující informace o jednotlivých pacientech, jako je například styl výživy, kouření či jiné environmentální faktory, které by na vznik nádorového onemocnění mohly mít vliv spolu

s další specifikací nádorového onemocnění. Zisk, zpracování těchto údajů a rozšíření jednotlivých skupin může být součástí některé z dalších prací na podobné téma. V návaznosti na tuto práci by bylo zároveň možné vyšetřit polymorfismy dalších genů kódujících biotransformační enzymy účastníci se druhé fáze (zejména N-acetyl transferázy, sulfo transferázy) a enzymy první fáze (cytochromy P450).

Jedno z možných vysvětlení, proč se sledované polymorfismy nevyskytují v určitém druhu populace častěji (jak se očekávalo), pak možná tkví právě v komplexnosti celého biotransformačního aparátu. Sledované geny tvoří jen jeho část. Tato práce brala v potaz pouze některé genetické faktory. Je třeba studovat další negenetické (např. environmentální) i genetické faktory k tomu, aby námi sledované frekvence protektivních a rizikových aspektů mohly být brány v potaz jako faktory zvyšující nebo snižující riziko nádorové transformace buněk.

7 BIBLIOGRAFIE

- [1] *ENCYKLOPEDIÉ LABORATORNÍ MEDICÍNY PRO KLINICKOU PRAXI* [online]. Projekt SEKK - ency, 2015 [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/>
- [2] COSTA, Lucio G. a David L. EATON. *Gene-environment interactions: fundamentals of ecogenetics*. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, 2006. ISBN 978-047-1467-816.
- [3] Multimediální skriptá. *Funkce buněk lidského těla* [online]. Praha: Univerzita Karlova, b.r. [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: <http://fbilt.cz/>
- [4] DOSTÁLEK, Miroslav. *Farmakokinetika*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1464-7.
- [5] TRUSH, Michael. Xenobiotic Biotransformation. In: *JHSPH: Courseware* [online]. Baltimore: Johns Hopkins University, 2008 [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: http://ocw.jhsph.edu/courses/publichealthtoxicology/PDFs/Lecture2_Trush.pdf
- [6] Disposition of Toxicants. *Essential of Toxicology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2010, s. 133-224. ISBN 978-0-07-174274-0.
- [7] EVANS, W. E. a EVANS. Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science*. b.r., **286**(5439), 487-491. DOI: 10.1126/science.286.5439.487. ISSN 00368075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.286.5439.487>
- [8] HYNIE, Sixtus. *Xenobiochemie: Přednášky pro mediky*. LF UK v Praze, 2005. Dostupné také z: <http://ulbld.lf1.cuni.cz/file/416/Xenobiochemie.pdf>
- [9] CASEY LAIZURE, S., Vanessa HERRING, Zheyi HU, Kevin WITBRODT a Robert B. PARKER. The Role of Human Carboxylesterases in Drug Metabolism: Have We Overlooked Their Importance?. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2013, **33**(2), 210-222. DOI: 10.1002/phar.1194. ISSN 02770008. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/phar.1194>
- [10] Procaine. In: *National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Database* [online]. USA: NCBI, 2005 [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/procaine>
- [11] Pseudocholinesterase deficiency. *Genetics Home Reference* [online]. U.S. National Library of Medicine, 2012 [cit. 2017-02-04]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/pseudocholinesterase-deficiency#resources>
- [12] EPHX1 gene. *Genetics Home Reference* [online]. U.S. National Library of Medicine, 2012 [cit. 2017-02-04]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/EPHX1#resources>
- [13] IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS., . *A review of human carcinogens*. 1. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2012. ISBN 978-928-3213-239.
- [14] BOLTON, Judy L., Michael A. TRUSH, Trevor M. PENNING, Glenn DRYHURST a Terrence J. MONKS. Role of Quinones in Toxicology †. *Chemical Research in Toxicology*. 2000, **13**(3), 135-160. DOI: 10.1021/tx9902082. ISSN 0893-228x. Dostupné

také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx9902082>

- [15] VAN KUILENBURG, A B, J HAASJES, D J RICHEL et al. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* [online]. 2000, **6**(12), 4705 [cit. 2017-02-04]. ISSN 10780432.
- [16] GOEDDE, HW a DP AGARWAL. Pharmacogenetics of aldehyde dehydrogenase. *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*. New York: Pergamon Press, 1992, , 281-311.
- [17] Glucuronidation. *Pediatric critical care* [online]. 3rd ed. Philadelphia, PA: Mosby-Elsevier, 2006, s. 1639-1658 [cit. 2017-02-04]. ISBN 9780323018081.
- [18] ZIGLARI, Tahereh a Abdolamir ALLAMEH. The Significance of Glutathione Conjugation in Aflatoxin Metabolism. *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. InTech, 2013. DOI: 10.5772/52096. ISBN 978-953-51-0904-4. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-recent-advances-and-future-prospects/the-significance-of-glutathione-conjugation-in-aflatoxin-metabolism>
- [19] ÜNLÜ, Ali, Nurcan Aras ATES, Lülüfer TAMER a Cengiz ATES. Relation of glutathione S-transferase T1, M1 and P1 genotypes and breast cancer risk. *Cell Biochemistry and Function* [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2008, **26**(5), 643-647 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1002/cbf.1490. ISSN 02636484.
- [20] Thiopurine S-methyltransferase deficiency. *Genetics Home Reference* [online]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine, 2015 [cit. 2017-02-04]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/thiopurine-s-methyltransferase-deficiency>
- [21] Kancerogeneze. *Zdravotnictví a medicína* [online]. 2002, **2002**(5) [cit. 2017-01-29]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/kancerogeneze-146719>
- [22] *Maligní transformace* [online]. In: . b.r. [cit. 2017-01-29]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/patfyz/pdf/new/MalignittransformacePP2005.pdf>
- [23] FORETOVÁ, Lenka, Marek SVOBODA a Ondřej SLABÝ. *Molekulární genetika v onkologii*. 1. vyd. Praha: Mladá fronta - Medical Services, 2014, 183 s. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3236-0.
- [24] *Genetika - Biologie* [online]. 2010 [cit. 2017-02-04]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz>
- [25] DOŠKAŘ, Jiří. *Přednášky z molekulární genetiky I: Mutace*. Brno, 2015.
- [26] FUTREAL, P. Andrew, Lachlan COIN, Mhairi MARSHALL, Thomas DOWN, Timothy HUBBARD, Richard WOOSTER, Nazneen RAHMAN a Michael R. STRATTON. *A census of human cancer genes*. b.r. DOI: 10.1038/nrc1299. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nrc1299>
- [27] TRNKA, Jan. *Volné radikály a antioxidanty* [online]. In: . Praha: Univerzita Karlova, 2014 [cit. 2017-02-04].
- [28] Radiační ochrana: Přírodní zdroje. *Státní ústav radiační ochrany* [online]. Praha: SÚRO, 2017 [cit. 2017-02-04]. Dostupné z: <https://www.suro.cz/cz/radiacni-ochrana/prirodni->

zdroje

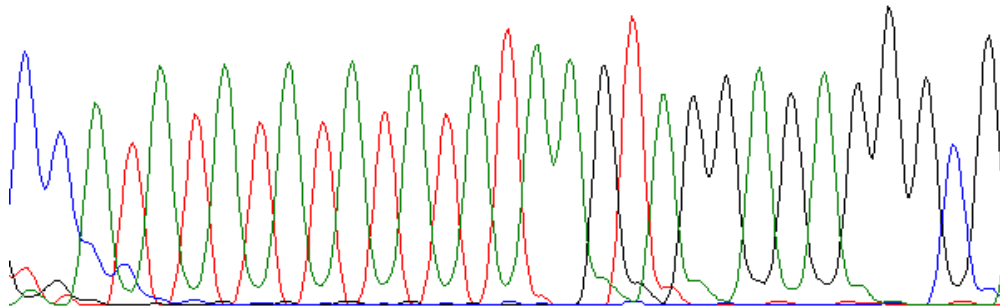
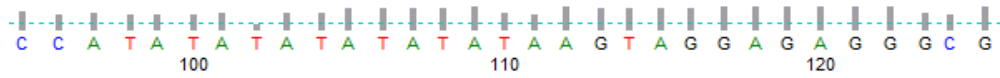
- [29] HOLEČEK, V. Oxidační stres u nádorových onemocnění. *Klinická biochemie a metabolismus*. Plzeň, 2010, **2010**(4), 225-230.
- [30] VÍTEK, Libor. *Bilirubin a interní choroby: význam pro kliniku a praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2351-8.
- [31] IVANA, Márová. *Biochemie II: Metabolismus dusíkatých látek*. Brno, 2015.
- [32] Labs: Maines Lab: History. In: *University of Rochester* [online]. New York: University of Rochester Medical Center Rochester, 2017 [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: <https://www.urmc.rochester.edu/labs/maines-lab/history.aspx>
- [33] CHUNG, Jacky, Caiyong CHEN a Barry H. PAW. Heme metabolism and erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology*. 2012, **19**(3), 156-162. DOI: 10.1097/MOH.0b013e328351c48b. ISSN 1065-6251. Dostupné také z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>
- [34] Serum bilirubin as a predictor of oxidative stress-mediated diseases. In: *Educational portal of 1-st Faculty of Medicine - Charles University of Prague* [online]. Praha: Univerzita Karlova, 2006 [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: <http://portal.lf1.cuni.cz/article-672-serum-bilirubin-as-a-predictor-of-oxidative-stress-mediated-diseases>
- [35] SHEKEEB SHAHAB, M., Praveen KUMAR, Neeraj SHARMA, Anil NARANG a Rajendra PRASAD. Evaluation of oxidant and antioxidant status in term neonates: a plausible protective role of bilirubin. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2008, **317**(1-2), 51-59. DOI: 10.1007/s11010-008-9807-4. ISSN 0300-8177. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11010-008-9807-4>
- [36] Enzyme: Glucuronosyl transferase. *ExPASy: Bioinformatics Resource Portal* [online]. Swiss: SIB Bioinformatics Resource Portal, 2017 [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: <http://enzyme.expasy.org/EC/2.4.1.17>
- [37] GUILLEMETTE, Chantal, Eric LÉVESQUE, Mario HARVEY, Judith BELLEMARE a Vincent MENARD. UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metabolism Reviews*. 2010, **42**(1), 24-44. DOI: 10.3109/03602530903210682. ISSN 0360-2532. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03602530903210682>
- [38] GIL, Justyna a Maria M SałSIADK. Gilbert syndrome: the UGT1A1 *28 promoter polymorphism as a biomarker of multifactorial diseases and drug metabolism. *Biomarkers in Medicine*. 2012, **6**(2), 223-230. DOI: 10.2217/bmm.12.4. ISSN 1752-0363. Dostupné také z: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/bmm.12.4>
- [39] PALOMAKI, Glenn E, Linda A BRADLEY, Michael P DOUGLAS, Katherine KOLOR a W David DOTSON. Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genetics in Medicine*. 2009, **11**(1), 21-34. DOI: 10.1097/GIM.0b013e31818efd77. ISSN 1098-3600. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1097/GIM.0b013e31818efd77>
- [40] WEI, M, HA SCHWERTNER, LW GIBBONS, Q ZHENG a TL MITCHELL. *Low fasting serum bilirubin as a predictor of cancer mortality in men*. *Hepatology*, 2000.

- [41] GUILLEMETTE, C, R C MILLIKAN, B NEWMAN a D E HOUSMAN. Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 and association with breast cancer among African Americans. *Cancer research* [online]. 2000, **60**(4), 950 [cit. 2017-02-17]. ISSN 00085472.
- [42] GOESSLING, Wolfram a Stephen D ZUCKER. Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma. *American Journal of Physiology*. 2000, **279**(2), 356-365.
- [43] JIRÁSKOVÁ, Alena, Jan NOVOTNÝ, Ladislav NOVOTNÝ et al. Association of serum bilirubin and promoter variations in HMOX1 and UGT1A1 genes with sporadic colorectal cancer. *International Journal of Cancer*. 2012, **131**(7), 1549-1555. DOI: 10.1002/ijc.27412. ISSN 00207136. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.27412>
- [44] VITEK, L. Impact of Serum Bilirubin on Human Diseases. *Pediatrics*. 2005, **115**(5), 1411-1412. DOI: 10.1542/peds.2004-1796. Dostupné také z: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2004-1796>
- [45] ZHONG, Shan, A. Forbes HOWIE, Brian KETTERER et al. Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 1991, **12**(9), 1533-1537. DOI: 10.1093/carcin/12.9.1533. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/12.9.1533>
- [46] HAYES, John D. a Richard C. STRANGE. Glutathione S-transferase Polymorphism and Their Biological Consequences. *Pharmacology*. 2000, **61**(3), 154-166.
- [47] HAYES, John D. a David J. PULFORD. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part II. *Journal Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1995, **30**(6), 521-600.
- [48] CHENG, Lie, Erich M. STURGIS, Susan A. EICHER a David CHAR. Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *International Journal of Cancer*. Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk o, **84**(3), 220–224.
- [49] FREMUTH, Jiří, Arpád BÓDAY a Jan SÝKORA. Analýza UGT 1A1*28 polymorfismu v oblasti TATA-box promotoru genu pro UDP-glukuronosyltransferázu u Gilberova syndromu v dětském věku. *Československá pediatrie*. 2005, **60**(1), 7-13. ISSN 0069-2328.
- [50] KIRAN, Beray, Mutlu KARKUCAK, Hakan OZAN, Tahsin YAKUT, Kemal OZERKAN, Sebnem SAG a Mehmet TURE. GST (GSTM1 , GSTT1 , and GSTP1) polymorphisms in the genetic susceptibility of Turkish patients to cervical cancer. *Journal of Gynecologic Oncology*. 2010, **21**(3), 169-. DOI: 10.3802/jgo.2010.21.3.169. ISSN 2005-0380. Dostupné také z: <https://synapse.koreamed.org/DOIX.php?id=10.3802/jgo.2010.21.3.169>
- [51] *Aplikovaná statistika* [online]. Hradec Králové: Univerzita Hradec Králové, 2011 [cit. 2017-02-14]. Dostupné z: <http://www.milankabrt.cz/testNezavislosti/index.php>

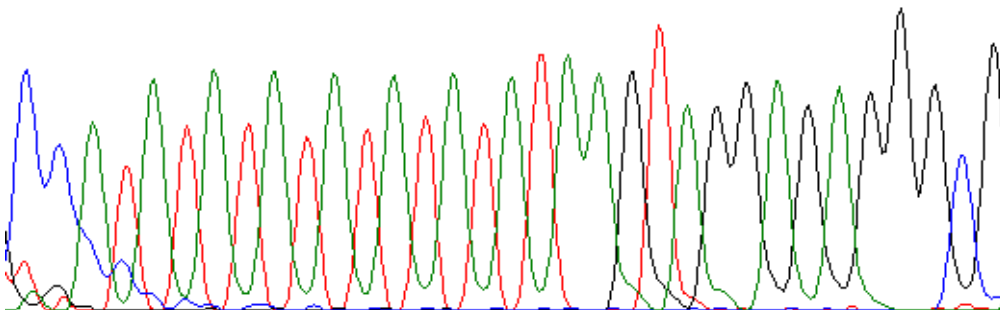
- [52] CLARIDGE, L. C., M. J. ARMSTRONG, C. BOOTH a P. S. GILL. *Gilbert's syndrome*. b.r. DOI: 10.1136/bmj.d2293. Dostupné také z: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.d2293>
- [53] G LIU, P GHADIRIAN D VESPRINI et al. Polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 and risk of pancreatic adenocarcinoma. *British Journal of Cancer* [online]. Nature Publishing Group, 2000, **82**(10), 1646 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1054/bjoc.2000.1221. ISSN 00070920.
- [54] RAMALHINHO, Ana Cristina, José Alberto FONSECA-MOUTINHO a Luiza BREITENFELD. *Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and breast cancer risk: a study in a Portuguese population*. b.r. DOI: 10.1007/s11010-011-0863-9. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11010-011-0863-9>
- [55] HELZLSOUER, K J, O SELMIN, H Y HUANG et al. Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* [online]. 1998, **90**(7), 512 [cit. 2017-02-23]. ISSN 00278874.
- [56] KARATZAS, Anastasios, Eirini GIANNATOOU, Vassilios TZORTZIS, Stavros GRAVAS, Evangellos ARAVANTINOS, George MOUTZOURIS, Michael MELEKOS a Aspasia TSEZOU. Genetic polymorphisms in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene and prostate cancer risk in Caucasian men. *Cancer Epidemiology*. 2010, **34**(3). DOI: 10.1016/j.canep.2010.02.009. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877782110000287>
- [57] WEI, Bingbing, Zhuoqun XU, You ZHOU et al. Association of GSTM1 Null Allele with Prostate Cancer Risk: Evidence from 36 Case-Control Studies. *PLoS One* [online]. San Francisco: Public Library of Science, 2012, **7**(10) [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1371/journal.pone.0046982.
- [58] Sørensen, Mette, Herman AUTRUP, Anne Tjønneland, Kim OVERVAD a Ole RAASCHOU-NIELSEN. Glutathione S-transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer. *International Journal of Cancer* [online]. Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2004, **110**(2), 219-224 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1002/ijc.20075. ISSN 00207136.

8 PŘÍLOHY

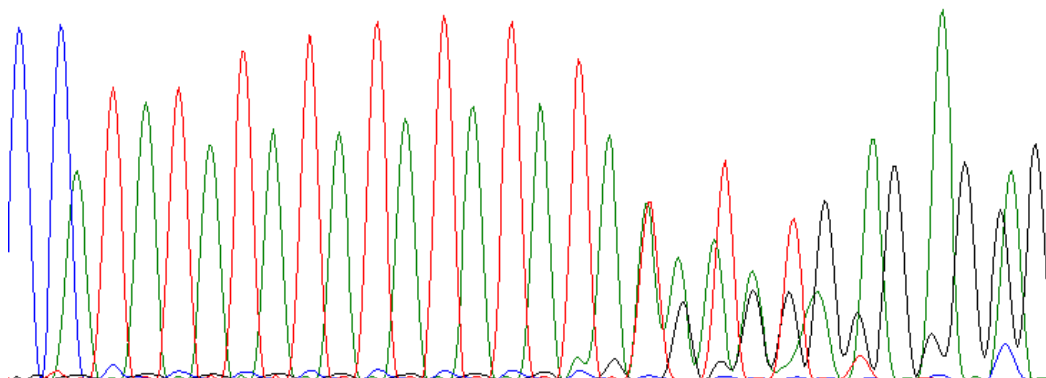
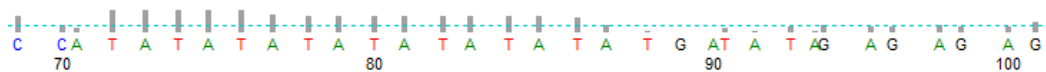
8.1 Elektroforegramy sekvenací promotorové oblasti genu UGT1A1



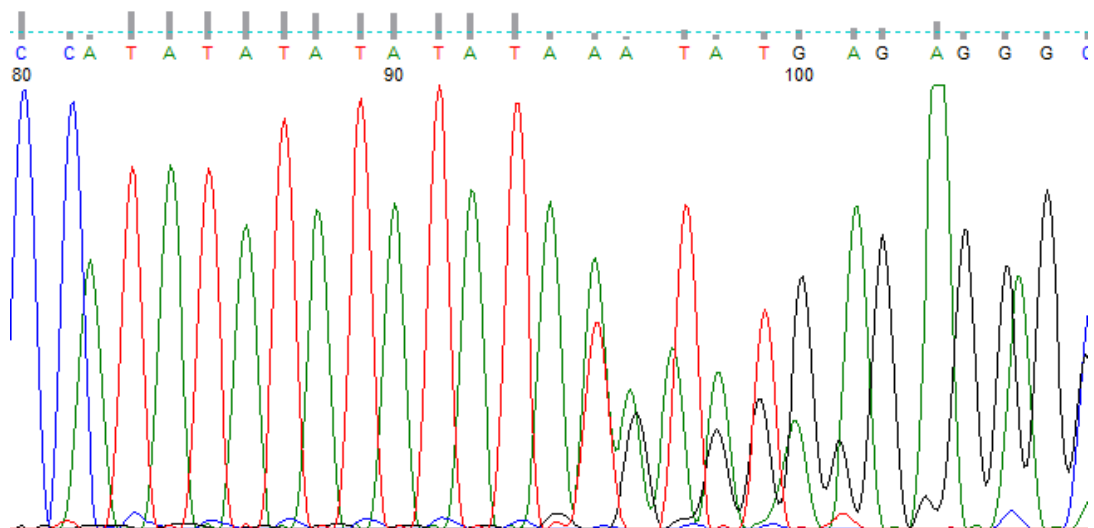
Obrázek 16 - Genotyp 6TA/6TA



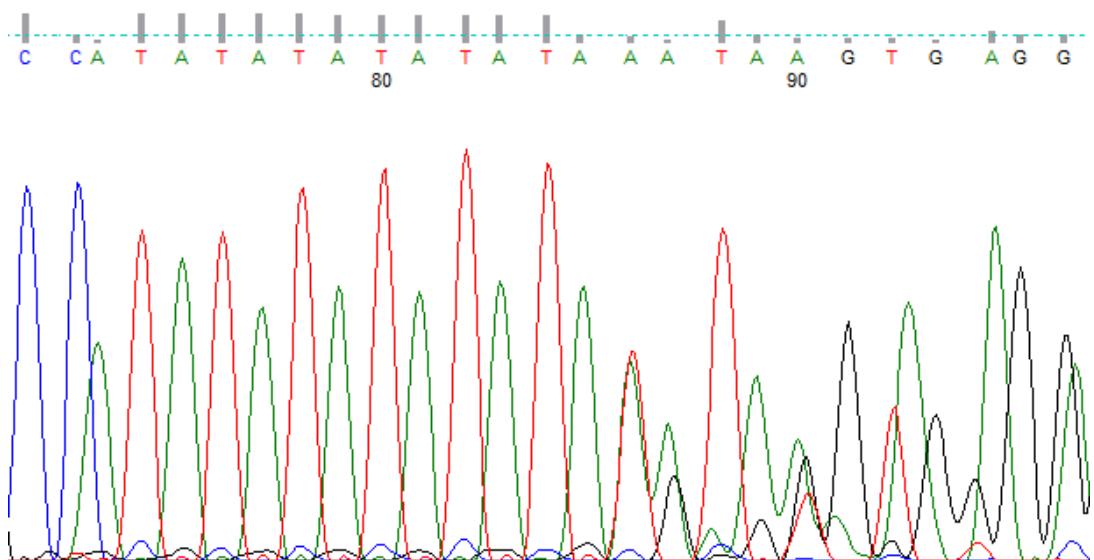
Obrázek 17 - Genotyp 7TA/7TA



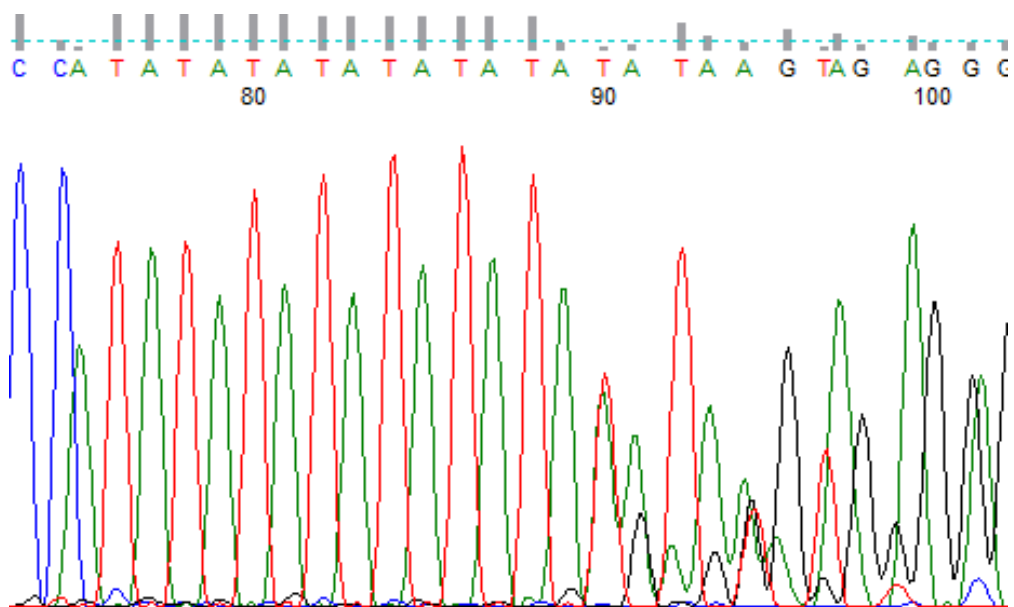
Obrázek 18 - Genotyp 7TA/8TA



Obrázek 19 - Genotyp 5TA/6TA



Obrázek 20 - Genotyp 5TA/7TA



Obrázek 21 - Genotyp 6TA/8TA

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALDH	aldehyd dehydrogenáza
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenosin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPD	dihydropyrimidin dehydrogenáza
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GS	Gilbertův syndrom
GST	glutathin-S transferázy
GSTM1	glutathion-S transferáza M1
GSTT1	glutathion-S transferáza T1
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl koenzym A
LOH	loss of heterozygosity
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NAT	N-acetyl transferázy
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAPS	3'-fosfoadenosin 5'-fosfo sulfát
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíkové sloučeniny
SAM	S-adenosyl methionin
SOD	superoxid dismutáza
SULT	sulfotransferázy
TBE	tris/kyselina boritá/EDTA
TEMED	tetramethylethylenediamin
UDP	uridindifosfoglukuronová kyselina
UGT	UDP-glukuronosyl transferázy
UGT1A1	UDP-glukuronosyl transferáza 1A1