

Genetic polymorphism in xenobiotics metabolizing enzymes as a susceptibility factor to cancer

Salagovic J, Kalina I, Dudas M

Genetický polymorfizmus enzýmov metabolizmu xenobiotík ako faktor susceptibility pri vzniku nádorových ochorení

Abstract

Salagovic J, Kalina I, Dudas M:
Genetic polymorphism in xenobiotics-metabolizing enzymes as a susceptibility factor to cancer
Bratisl Lek Listy 2000; 101 (9): 512–521

Organisms are exposed to a large number of xenobiotics (compounds foreign to the body), such as drugs, pesticides, natural food constituents and so on. To deal with these, usually lipophilic substances, a range of biotransformation enzyme systems are available. Experimental data have shown that metabolic activation and detoxification play an important role in chemical carcinogenesis. There is a considerable interindividual genetic variability in these pathways which might explain the differences in cancer susceptibility and might ultimately enable the identification of people at increased risk and to offer individualized cancer prevention. Recently, molecular genetic bases of many polymorphic enzyme activities involved in xenobiotics metabolism have been elucidated. The purpose of this article is to provide a brief review of recent findings concerning the association of genetically determined metabolic variants with different risks of environmentally induced cancer. (Tab. 6, Fig. 1, Ref. 30.)

Key words: xenobiotics metabolism, polymorphism, susceptibility, cancer.

Susceptibilita k nádorovým ochoreniam

Niekoľko desaťročí epidemiologického výskumu preukázalo, že väčšina (podľa údajov WHO je to až 80–90 %) nádorových ochorení v ľudskej populácii je zapríčinená environmentálnymi faktormi širokého spektra, ako sú napr. fajčenie, strava, alkohol, infekčné agensy, exogénne a endogénne hormóny, rádiácia, profe-

Abstrakt

Šalagovič J., Kalina I., Dudáš M.:
Genetický polymorfizmus enzýmov metabolizmu xenobiotík ako faktor susceptibility pri vzniku nádorových ochorení
Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 9, s. 512–521

Ľudský organizmus je permanentne vystavený veľkému množstvu xenobiotík (látok cudzích pre ľudský organizmus), ako sú liečivá, pesticídy, látky obsiahnuté v potrave a podobne. Na vysporiadanie sa s týmito, obyčajne lipofilnými substanciami má organizmus k dispozícii rozsiahly biotransformačný enzymatický systém. Experimentálne údaje preukázali dôležitú úlohu metabolickej aktivácie a detoxifikácie v procese chemickej karcinogenézy. V uvedených metabolických dráhach sa zistila značná interindividuálna genetická variabilita, čo môže vysvetľovať závažné rozdiely v susceptibilitě (vnímavosti) k vzniku nádorových ochorení u jednotlivcov. Na základe týchto údajov možno identifikovať ľudí so zvýšeným rizikom vzniku tumorov a poskytovať individuálnu prevenciu v boji proti rakovine. V súčasnosti už bola odhalená molekulo-geometická podstata polymorfizmov mnohých enzýmov metabolizmu xenobiotík. Cieľom tejto práce je podať stručný prehľad súčasných poznatkov o asociácii geneticky podmienených metabolických polymorfizmov s rozdielnym rizikom vzniku environmentálne indukovaných tumorov. (Tab. 6, obr. 1, lit. 30.)
Kľúčové slová: metabolizmus xenobiotík, polymorfizmus, susceptibilita, nádorové ochorenie.

sionálna expozícia. V súčasnosti sme účinkom týchto faktorov vo väčšej či menšej miere vystavení takmer všetci. Napriek tomu dochádza ku vzniku tumorov a malígnemu zvrhnutiu buniek len u niektorých jedincov. Azda najmarkantnejším príkladom je fajčenie: napriek dokázanej jasnej a veľmi silnej kauzálnej súvislosti fajčenia so vznikom pľúcnych nádorov, len 1 z 10 silných fajčiarov je postihnutý daným malígnym ochorením (26). Príčinou je rozdiel-

Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Safarikensis University, Kosice. medbiol@central.medic.upjs.sk

Address for correspondence: J. Salagovic, Mgr, PhD, Dpt of Medical Biology UPJS, Trieda SNP 1, SK-040 66 Kosice, Slovakia.

Ústav lekárskej biológie Lekárskej fakulty Univerzity P.J. Šafárika v Košiciach

Adresa: Mgr. J. Šalagovič, CSc., Ústav lekárskej biológie LF UPJŠ, Trieda SNP 1, 040 66 Košice.

na interindividuálnu vnímavosť — *susceptibilita* k uvedeným karcinogénnym expozíciám. Kým niektorí jedinci sú vnímaví a veľmi citlivo reagujú už na veľmi nízke hladiny karcinogénnych látok, iní sú rezistentní i voči vyšším hladinám expozície environmentálnym karcinogénom. Faktorov, ktoré podmieňujú či modifikujú danú individuálnu susceptibilitu u každého jedinca, je mnoho. Patria sem pohlavie, vek, rasová príslušnosť, nutričné faktory, zdravotný stav a podobne. Veľmi dôležitú úlohu majú geneticky podmienené faktory susceptibilitu k nádorovým ochoreniam. Pri ich skúmaní a objasňovaní poskytol nové možnosti významný pokrok v molekulo-geometických technológiách. Na základe množstva dôkazov bola odhalená existencia značných interindividuálnych variácií v génoch, ktorých produkty sa priamo či nepriamo zúčastňujú na viacstupňovom procese karcinogenézy (obr. 1). To bolo podnetom pre vznik hypotézy, podľa ktorej riziko vzniku tumorov vyplývajúce z expozícií environmentálnym karcinogénom a mutagénom môže byť modifikované všeobecnými genetickými polymorfizmami enzýmov zúčastňujúcich sa na uvedených procesoch. Takéto interakcie medzi génmi a prostredím môžu mať dôležitú úlohu pri determinácii rizika vzniku nádorových ochorení u exponovaných jedincov.

Genetické faktory ovplyvňujúce susceptibilitu

V minulosti sa pri skúmaní genetických faktorov ovplyvňujúcich susceptibilitu pozornosť epidemiologických štúdií zameriavala skôr na zriedkavé genetické mutácie, ktoré znamenajú pre ich nositeľov veľmi vysoké riziko vzniku nádorového ochorenia (v niektorých prípadoch až 100 %). Tieto mutácie sa však v populácii vyskytujú s veľmi nízkou frekvenciou (väčšinou menej ako 0,1 %) a objasňujú dedičnosť len veľmi malej časti (približne len 5 %) nádorových ochorení. Ide hlavne o mutácie v tumor-supresorových génoch vedúce k ochoreniam, ako napr. Li-Fraumeniho syndróm, familiárny retinoblastóm (bilaterálny), či Wilmsov tumor (bilaterálny) a mutácie zapríčiňujúce defekty v opravách poškodenej DNA (defektný DNA repair) a chromozómovú instabilitu vedúce k ochoreniam, ako ataxia teleangiectasia, Bloomov syndróm, či xeroderma pigmentosum) (tab. 1).

Mohutný nástup molekulo-biologických technológií v poslednom desaťročí priniesol ohromné množstvo detailných genetických informácií a stávalo sa stále viac a viac jasným, že takéto predetermi-

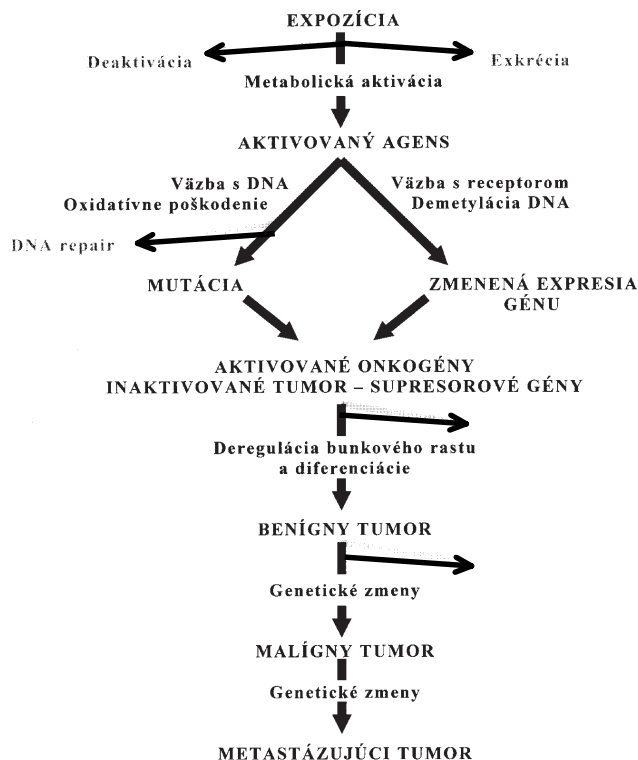


Fig. 1. Particular levels of multistep process of carcinogenesis that can be influenced by genetic polymorphism (modified to Perera, 1996). Obr. 1. Schéma viacstupňového procesu karcinogenézy a jeho jednotlivé úrovne ovplyvniteľné genetickými polymorfizmami (modifikované podľa Perera, 1996).

nujúce mutácie sú zodpovedné len za malú časť tumorov. Do popredia záujmu sa dostávajú mutácie, resp. polymorfizmy v génoch, ktoré len v relatívne malej miere predisponujú jednotlivých jedincov k vzniku nádorového ochorenia, ale tieto gény a ich mutované alely sú v rámci ľudskej populácie veľmi bežné. Ich produkty sú činné v metabolizme karcinogénov alebo antikarcinogénov, zúčastňujú sa na DNA reparačných procesoch a sú zapojené do regulácie bunkového cyklu

Tab. 1. Rare inherited disorders (syndromes) with very high susceptibility to cancer.

Syndrome - congenital disease	Occurrence	Risk of tumor development	Mechanism
Li-Fraumeni syndrome	<0.1%	breast and other	deletion/inactivation
Familial retinoblastoma	<0.1%	retinoblastoma	tumor
Wilms tumor (bilateral)	<0.1%	urinary bladder	of the suppressor
Familial adenomatous polyposis	<0.1%	colon	gene
Congenital non-polypous cancer of the colon	<0.1%	colon	defective DNA repair
Ataxia teleangiectasia, homozygotes	<0.1%	skin, breast and other	
Ataxia teleangiectasia, heterozygotes	1.0%	breast and other	
Xeroderma pigmentosum	<0.1%	skin	
Bloom syndrome	<0.1%	skin and other	

Tab. 1. Zriedkavé dedičné ochorenie (syndrómy) s vysokou susceptibilitou k nádorovým ochoreniam.

Syndróm - dedičné ochorenie	Výskyt	Riziko vzniku tumoru	Mechanizmus
Li-Fraumeniho syndróm	<0.1%	prsníka a iné	delécia/inaktivácia
Familiárny retinoblastóm	<0.1%	retinoblastóm	tumor
Wilmsov tumor (bilater.)	<0.1%	močového mechúra	supresorového
Familiárna adenomatózna polypóza	<0.1%	hrubého čreva	génu
Dedičná nepolypózna rakovina hrubého čreva	<0.1%	hrubého čreva	defektný DNA repair
Ataxia teleangiectasia, homozygoti	<0.1%	kože, prsníka a iné	
Ataxia teleangiectasia, heterozygoti	1.0%	prsníka a iné	
Xeroderma pigmentosum	<0.1%	kože	
Bloomov syndróm	<0.1%	kože a iné	

Tab. 2. Reactions and enzymes involved in metabolism of xenobiotics.

Reaction	Enzymes
<i>Phase 1</i>	
Oxidation	Cytochrome P450, peroxidases, flavin monoxygenases, monoamine oxidases, alcohol dehydrogenases, aldehyde dehydrogenases
Epoxidation	
Cytochrome P450	
Reduction	Cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450, reductases, quinone, reductases
Dealkylation	Cytochrome P450
Hydrolysis	Carboxyl esterases, amidases
Dehalogenation	Cytochrome P450
<i>Phase 2</i>	
Conjugation with glucuronic acid	UDP-glucuronyl transferase
Conjugation with sulphates	Sulphotransferases
Conjugation with glutathione	Glutathione S-transferases
Acetylation	N-acetyl transferases
Conjugation with amino acids	transferases
Metlyation	Methyl transferases
Hydratation	Epoxide hydrolase
<i>Phase 3</i>	
Production of mercapturic acid from conjugates with glutathione	Peptidases and N-acetyl transferases
Bioactivation of conjugates with cysteine	Beta lyases

a imunitných procesov. Keďže len malou mierou prispievajú k zvýšeniu rizika vzniku ochorenia a ich účinok sa prejaví len pri určitej expozícii, veľmi ťažko ich identifikovať. Príčina a účinok nie sú také jasné a zreteľné ako pri vysokorizikových génoch.

Podľa už uvedenej hypotézy je pri genotoxikkej expozícii individua riziko vzniku nádorového ochorenia ovplyvňované všetkými polymorfizmami génov, ktorých produkty sa priamo či nepriamo zúčastňujú na metabolických pochodoch a interakciách daného karcinogénu či mutagénu od jeho vstupu do organizmu až po jeho prípadnú interakciu s DNA a vznik mutácie, resp. až po jeho detoxifikáciu a exkréciu z tela von. Každý zo zúčastnených variantov (polymorfizmov) môže svojou mierou posunúť riziko smerom k vzniku mutácií alebo naopak k detoxifikácii a vylúčeniu. Aj keď je vplyv jednotlivých polymorfizmov na výsledné riziko vzniku tumorov relatívne malý, suma všetkých zúčastňujúcich sa variantov by mala udávať celkové výsledné riziko vzniku tumoru pre dané individuum pri expozícii daným karcinogénom.

Keďže takmer všetky karcinogény, ktorými môže byť súčasný človek exponovaný, si vyžadujú metabolickú aktiváciu, alebo naopak môžu byť metabolicky deaktivované, polymorfizmus enzýmov metabolizmu xenobiotík (EMX) patrí k najdôležitejším faktorom, ktorý môžu ovplyvňovať individuálnu susceptibilitu k vzniku nádorových ochorení.

Enzýmy metabolizmu xenobiotík

Ľudský organizmus je permanentne vystavený veľkému množstvu xenobiotík (látok cudzích pre ľudský organizmus), ako sú

Tab. 2. Reakcie a enzýmy zúčastňujúce sa na metabolizme xenobiotík.

Reakcia	Enzýmy
<i>Fáza 1:</i>	
Oxidácia	Cytochróm P450, peroxidázy, flavínové monoxygenázy, monoamínové oxidázy, alkoholdehydrogenázy, aldehyddehydrogenázy
Epoxidácia	Cytochróm P450
Redukcia	Cytochróm P450, NADPH-cytochróm P450 reduktázy, chinón reduktázy
Dealkylácia	Cytochróm P450
Hydrolyza	Karboxylesterázy, amidázy
Dehalogenácia	Cytochróm P450
<i>Fáza 2:</i>	
Konjugácia s kyselinou glukuronovou	UDP-glukuronyl transferáza
Konjugácia so sulfátmi	Sulfotransferázy
Konjugácia s glutatiónom	Glutatión S-transferázy
Acetylácia	N-acetyltransferázy
Konjugácia s aminokyselinami	Transferázy
Metylácia	Metyltransferázy
Hydratácia	Epoxidhydroláza
<i>Fáza 3:</i>	
Tvorba kyseliny merkapturovej z konjugátov s glutatiónom	Peptidázy a N-acetyltransferázy
Bioaktívacia konjugátov s cysteínom	β-Lyázy

liečivá, pesticídy, konzervačné látky a podobne. Na vysporiadanie sa s týmito, obvyčajne lipofilnými substanciami, má organizmus k dispozícii rozsiahly biotransformačný enzymatický systém, ktorý všeobecne rozdeľujeme na enzýmy I. a II. fázy, niekedy aj III. fázy (tab. 2). V I. fáze, kde viac ako 90 % enzýmov pripadá na systém cytochrómu P450, xenobiotikum podlieha transformácii zavedením funkčnej skupiny, zvyčajne jednej alebo viacerých hydroxylových skupín. Enzýmy II. fázy — ako napr. glutatión S-transferázy, N-acetyltransferázy či sulfotransferázy — akceptujú metabolizovaný produkt I. fázy (alebo inú endogénnu či exogénnu zlúčeninu s funkčnou skupinou) ako substrát, využívajú funkčnú skupinu na konjugáciu s glutatiónom, kyselinou glukuronovou, sulfátom, cysteínom alebo acetátom. Výsledným produktom je hydrofilný derivát, ktorý môže byť ľahko vylúčený do moču alebo žlče. Aj keď spoločným účinkom enzýmov oboch fáz (I. aj II.) je všeobecne detoxifikácia cudzej zlúčeniny, mnoho medziproduktov, hlavne I. fázy, sú elektrofilné substráty, ktoré môže interagovať s DNA a proteínmi, vytvárať s nimi adukty a pôsobiť ako silné mutagény či karcinogény (tab. 3). Preto o I. fáze často hovoríme ako o fáze „aktívnej“.

Procesy súvisiace s ďalším metabolizmom produktov II. fázy sa niekedy označujú ako III. fáza metabolizmu xenobiotík. Patria sem enzýmy katalyzujúce tvorbu merkapturových kyselín z glutatiónových konjugátov, či enzýmy pre bioaktíváciu cysteínových konjugátov.

Miera účinku xenobiotík a ich metabolitov v živom organizme je značne ovplyvnená i transportnými dejmi v rámci bunky. K najzaujímavejším transportérom (prenašateľom) nepochybne pat-

Tab. 3. Examples of xenobiotics activated by human xenobiotics metabolism enzymes.

Enzyme	Chemical substance
CYP1A1	benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)
CYP1A2	aflatoxin B1, 4-aminobiphenyl, acetaminophene, 2-naphthylamine, 2-aminofluorene, products of amino acids pyrolysis, NNK, MeIQ, paracetamol, bromobenzene
CYP1A6	N-nitrosodiethylamine and other nitrosoamines
CYP2B6	cyclophosphamide, 6-aminochrysene, iphosphamine
CYP2E1	acetaminophene, benzene, carbon tetrachloromethane, haloalkanes, N-nitrosodimethylamine, acrylonitrile, ethylcarbamate, chloroform, vinyl chloride, ethylene dibromide, styrene, diethyl ether, halothane, trichloroethylene, paracetamol
CYP2F	3-methylindole, naphthalene
CYP3A4	acetaminophene, B1 and G1 aflatoxins, iphosphamide, cyclophosphamide, sterigmatocystine, trichloroethylene, 6-aminochrysene, 1-nitropyrene, senecionine
NAT	N-hydroxylamines
GST	haloalkanes, haloalkenes
EPH	diols PAH
SULT	PAH

CYP–cytochrome, *EPH* – epoxide hydrolase, *NAT* – *N*-acetyl transferase, *GST*–glutathione *S*-transferase, *SULT* – sulphotransferase

NNP–4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone

MeIQ–2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline

PAH–polycyclic aromatic hydrocarbons

Tab. 3. Príklady aktivácie xenobiotík enzýmami metabolizmu xenobiotík u človeka.

Enzým	Chemická látka
CYP1A1	benzo(a)pyrén a iné polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU)
CYP1A2	aflatoxín B1, 4-aminobifenyl, acetaminofén, 2-naftylamin, 2-aminofluorén, produkty pyrolýzy aminokyselín, NNK, MeIQ, paracetamol, brómbenzén
CYP2A6	N-nitrozodietylamin a iné nitrozoamíny
CYP2B6	cyklofosfamid, 6-aminochryzén, ifosfamín
CYP2E1	acetaminofén, benzén, karbón tetrachlórmetán, haloalkány, N-nitrozodimetylamin, akrylonitril, etylkarbamát, chloroform, vinylchlorid, etyléndibromid, styrén, dietyléter, halotán, trichlórtylén, paracetamol
CYP2F	3-metylnol, naftalén
CYP3A4	acetaminofén, aflatoxín B1 a G1, ifosfamid, cyklofosfamid, sterigmatocystín, trichlórtylén, 6-aminochryzén, 1-nitropyrén, senecionín
NAT	N-hydroxylamíny
GST	haloalkány, haloalkény
EPH	dioly PAU
SULT	PAU

CYP – cytochróm, *EPH* – epoxidhydróláza, *NAT* – *N*-acetyltransferáza, *GST* – glutatión *S*-transferáza, *SULT* – sulfotransferáza

NNP – 4-(metylnitrozoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanón

MeIQ – 2-amino-3,4-dimetylimidazo[4,5-f]chinoxalín

PAU – polycyklické aromatické uhľovodíky

ria MDR1 (multidrug resistance) (P-glykoproteín) a MRP (multidrug resistance associated protein), ktoré sa oba zúčastňujú na rezistencii, ktorú preukazujú niektoré bunky voči pôsobeniu cytostatických agensov (21). Presná úloha týchto proteínov v procese (anti)karcinogenézy nebola dosiaľ úplne zodpovedaná.

V 60.—70. rokoch sa EMX zvyčajne opisovali ako „detoxifikačný systém pečene“ zodpovedný za degradáciu liečiv a cudzích látok z prostredia, ktorý má napomáhať pri ich exkrécii (9, 30). Táto koncepcia sa dodnes všeobecne uznáva, no „detoxifikácia liečiv“ pravdepodobne reprezentuje len menej ako 1 % všetkých funkcií EMX. Zvyšných 99 % predstavuje syntézu a degradáciu mnohých známych nepeptidových látok zúčastňujúcich sa na fyziologických bunkových pochodoch. Tu patria i všetky známe nebielkovinové molekuly zapojené do transkripčných procesov modulovaných receptorovými ligandmi, vrátane regulácie na úrovni druhého posla. Každá zmena v metabolizme týchto látok má priamy vplyv na reguláciu bunkového rastu, diferenciáciu, apoptózu, homeostázu, elektrolytickú rovnováhu a neuroendokrinné funkcie (17). Exogénne molekuly (liečivá či iné xenobiotiká) môžu svojou väzbou napodobniť pripojenie fyziologického ligandu na niektorý z bunkových receptorov. Okrem možného falošného informačného významu s bezprostredným efektom na bunku, sa po takejto väzbe xenobiotika na receptor spustí aj zložitá späťoväzbová regulácia signálovej transdukcie vrátane zmeny metabolizmu zúčastnených nepeptidových molekúl. Postranným minoritným efektom, popri ovplyvnení premeny fyziologických substrátov, je v konečnom dôsledku i zmena v procesoch metabolizmu xenobiotík.

Niektoré štúdie preukázali, že rozdiely v afinitě k tzv. „receptorom EMX“ (kde môžeme zaradiť napr. estrogénové a androgénové receptory, či dioxín-viažuci Ah-receptor (AHR)) môžu byť

dôležitými determinantmi rizika vzniku niektorých nádorových ochorení (20). Napriek tomu genetická variácia účinnosti, s ktorou sa ligandy naväzujú na receptory, je ešte hľadiska rozdielnej susceptibility dosiaľ málo preštudovaná.

Mnohé súčasné štúdie poukazujú na značné (niekedy i viac ako 1000-násobné) interindividuálne rozdiely v hladinách enzýmov metabolizmu xenobiotík (28). Príčiny týchto rozdielov môžu byť environmentálneho pôvodu alebo genetické.

Environmentálna (chemická) modulácia aktivity enzýmov metabolizmu xenobiotík (EMX)

Už začiatkom 60. rokov sa postupne prichádzalo na to, že aktivita väčšiny EMX je modulovateľná liečivami alebo environmentálnymi polutantmi (9, 15). Neskôr sa ukázalo, že hlavne enzýmy I. fázy metabolizmu xenobiotík môžu byť indukované alebo inhibované rôznymi chemickými zlúčeninami (6) (tab. 4). Inducibilita niektorých enzýmov, napr. CYP1A1, navyše preukazuje genetický polymorfizmus. Mnohé chemikálie, ako napr. barbituráty alebo polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU), majú schopnosť indukovať pleiotropnú reakciu spôsobenú súčasným zvýšením aktivity mnohých enzýmov zároveň (12); niektoré xenobiotiká sú skutočne schopné simultánne zvýšiť alebo znížiť aktivity rozdielnych oxidačných enzýmov.

Z daného hľadiska je preto veľmi dôležité poznať čo najpresnejšie expozičné faktory, ktoré pôsobia v etiológii daného ochorenia a metabolické cesty, ktorými prechádzajú v ľudskom organizme. Na základe týchto faktov potom možno uskutočniť genotypizáciu enzýmov zúčastňujúcich sa na metabolizme príslušnej genotoxickéj látky a určiť zodpovedajúce riziko vzniku nádorového ochorenia.

Tab. 4. Known inducers of human xenobiotics metabolism enzymes.

Enzymes	Inducers
CYP1A1	Aromatic hydrocarbons, cigarette smoke, smoked food, dioxins, methylcholantrene, omeprazol
CYP1A2	Aromatic hydrocarbons, cigarette smoke, smoked food, dioxins, omeprazol, vegetables as cabbage, (brassicaceae), PBB
CYP2S6	barbiturate
CYP2B6	barbiturates
CYP2C9	barbiturates, rifampicine
CYP2C19	rifampicine
CYP2E1	ethanol, isoniazid
CYP3A4	carbamazepine, dexamethasone, phenobarbital, phenytoin, sulphadimidine, rifampicine
CYP4A11	clofibrate,
NOQ	dioxin
EPH	phenobarbital, phenytoin

CYP – cytochrome, NOQ–NAD(P)H: quinone reductase, EPH–epoxide hydrolase

Tab. 4. Doteraz známe induktry niektorých enzýmov metabolizmu xenobiotík u človeka.

Enzým	Induktry
CYP1A1	aromatické uhľovodíky, cigaretový dym, údené potraviny, dioxíny, metylcholantren, omeprazol
CYP1A2	aromatické uhľovodíky, cigaretový dym, údené potraviny, dioxíny, omeprazol, zelenina ako kapusta, kel (čeľad' kapustovité), PBB
CYP2A6	barbituráty
CYP2B6	barbituráty
CYP2C9	barbituráty, rifampicín
CYP2C19	rifampicín
CYP2E1	etanol, izoniazid
CYP3A4	karbamazepín, dexametazón, fenobarbital, fenytoín, sulfadimidín, rifampicín
CYP4A11	klofibrát
NOQ1	dioxín
EPH	fenobarbital, fenytoín

CYP – cytochróm, NOQ – NAD(P)H: chinónreduktáza, EPH – epoxidhydróláza

Genetická modulácia aktivity enzýmov metabolizmu xenobiotík (EMX)

Dôležitým „vedľajším produktom“ pri mapovaní ľudského génu bolo zistenie veľkej rozmanitosti u ľudí na genómovej úrovni. Okrem variantov, ktoré boli doteraz charakterizované ako RFLP polymorfizmy (restriction fragment length polymorphism), či VNTR (variable number of tandem repeats), príp. STR (short tandem repeats) lokusy, pribudol nový marker DNA variability — tzv. SNP polymorfizmus (single nucleotide polymorphism). O „polymorfizme jednotlivých nukleotidov (single nucleotide polymorphism — SNP)“ hovoríme, ak sú pri skríningu viacerých jednotlivcov, prítomné v určitej pozícii rozdielne bázové páry (bp) s frekvenciou 1 % a viac, na rozdiel od „mikroheterogenity“, kde je frekvencia rozdielných bp menej ako 1% (18). Na základe doterajších zistení sa predpokladá existencia 6—30 miliónov SNP, čo znamená, že približne každých 100—500 bp môže byť polymorfny (25). Napr. pre gén veľkosti približne 20 kilobáz by to znamenalo 40—200 SNP.

Preto neprekvapuje, že aj pri enzýmoch metabolizmu xenobiotík sa zistilo množstvo polymorfizmov v príslušných kódujúcich génoch (tab. 5). Táto genetická variabilita vedie k výskytu najmenej dvoch fenotypov: Jedinci s normálnou metabolickou kapacitou sa označujú ako rýchli, extenzívni, resp. *silní metabolizéri*, kým jedinci s nízkou metabolickou kapacitou spôsobenou enzýmovým defektom, ako pomalí či *slabí metabolizéri*. Genetickými metódami možno zistiť aj tzv. intermediárne (heterozygotné) metabolické typy. V závislosti od enzýmu a jeho funkcie by potom jeden fenotyp mal zvyšovať a druhý naopak znižovať (geno)toxické riziko vyplývajúce z expozície príslušnou špecifickou chemikáliou. Výsledky jednotlivých epidemiologických štúdií pre ten istý polymorfizmus a zhodné ochorenie sú však často nejednotné. Určiť štatistickú významnosť asociácie medzi genetickým polymorfizmom a susceptibilitou k určitému malígnemu ochoreniu je preto ťažké. Príčiny spôsobujúce túto nejednotnosť výsledkov môžu byť (okrem bežných faktorov, ako napr. nespráv-

ne a nedostatočné určovanie expozičných faktorov zahrnutých v etiológii daného ochorenia, nejednotné štatistické vyhodnocovanie, malé počty osôb vo vyšetrovaných skupinách či nesprávne zvolená kontrolná skupina) veľmi rozmanité.

Problémy interpretácie vzťahov medzi genetickým polymorfizmom EMX a susceptibilitou k tumorom

Zvýšenú pozornosť treba venovať všetkým fenotypovým prejavom, pretože oba — *slabí i silní metabolizéri*, sa môžu simultánne zúčastňovať na zvýšení i znížení bioaktívácie špecifických xenobiotík. Napríklad pri tzv. *rýchlych acetylátoroch* (genetick polymorfizmus v génoch NAT2 a NAT1) bola preukázaná zvýšená susceptibilita k nádorom hrubého čreva a diabetu I. typu, kým pri tzv. *pomalých acetylátoroch* sa zistila zvýšená susceptibilita k nádorom močového mechúra, lupus erythematosus, ochoreniam pečene a liekmi indukovannej neurotoxicite (3).

Pri tzv. *extenzívnych metabolizéroch debrizochínu* (genetick polymorfizmus v géne CYP2D6) sa zistilo zvýšené riziko vzniku pľúcnych nádorov (u fajčiarov), hepatocelulárnych karcinómov a karcinómov gastrointestinálneho traktu, kým naopak tzv. *slabí metabolizéri* preukazovali akútnu idiosynkratickú reakciu pri podaní adrenergických blokátorov (16).

Z uvedeného vyplýva, že *alelické varianty toho istého génu*, ktoré majú protichodný účinok (t.j. spôsobujú zvýšenú alebo zníženú aktivitu enzýmu), môžu byť obe príčinou zvýšenej susceptibility k nádorovým ochoreniam, aj keď rôznymi spôsobmi. Klasickým príkladom je už uvedený polymorfizmus v géne CYP2D6: pri „*extenzívnych*“ metabolizéroch môže zvyšovať aktiváciu genotoxických látok na DNA-reaktívne produkty, kým pri „*slabých*“ metabolizéroch môže spôsobiť akumuláciu nemetabolizovaných liekov, ktorá môže spôsobiť nekrózu tkaniva. Obe — mutácie indukované DNA poškodením, i bunková proliferácia indukovaná nekrozou, sú udalosťami zúčastňujúcimi sa na procese karcinogenézy (2).

Častým problémom je *prekrývajúca sa afinita* k jednému substrátu pri niekoľkých enzýmoch navzájom. Tak sa môže stať, že

Tab. 5. Characteristics of the most important human xenobiotics metabolism enzymes in relation to genetic polymorphism.

Enzyme	Chromosome localization	Polymorphism	Functional subsequence of polymorphic alleles	Relation of polymorphism to the disease
CYP1A1	15q22-qter	yes	various inducibility	bronchogenic carcinomas, tumors of the breast, mouth and pharynx
CYP1A2	15q22-qter	yes?	three various phenotypes	tumors of liver, colon and urinary bladder
CYP1B1	2p22-p21	yes	enzyme deficiency	congenital glaucoma
CYP2A6	19q13.1-13.2	yes	defective enzyme	tumors of nasopharynx, effect on the metabolism of medicaments
CYP2A7	19q13.1-13.2	no		
CYP2B6	19q13.1-13.2	no		
CYP2C9	10q24.1-24.3	yes	partial deficiency	effect on the metabolism of medicaments
CYP2C19	10q24.1-24.3	yes	deficiency of enzyme	effect on the metabolism of medicaments
CYP2D6	22q13.1	yes	various phenotype	Parkinson syndrome, tumors of the lungs, pharynx, urinary bladder, manifestations stomach, meningeomas, astrocytomas, leucaemia, metabolism of medicaments
CYP2E1	10q24.3-qter	yes	partial deficiency	tumors of the lungs, nasopharynx, hepatocellular carcinoma, diseases of the liver induced by alcohol, effect on the metabolism of medication
CYP2F1	19q13.1-13.2	yes	?	toxic impairment of pulmonary parenchyma
CYP3A4	7q22.1	no		
NQO1	6p25	yes	partial deficiency	pulmonary tumors
FMO3	1q23-q25	yes	partial deficiency	trimethylaminuria (syndrome of fish smell)
EPH	1q42.1	yes	both increase and decrease of enzymatic activity	pulmonary tumor, hepatocellular carcinoma
NAT1	8p23.1-p21.3	yes	deficiency of enzyme	tumors of the colon and urinary bladder
NAT2	8p23.1-p21.3	yes	partial deficiency	tumors of the lungs, colon and urinary bladder, SLE,
GSTM1	1p13.3	yes	deficiency of enzyme	diabetes of I type
GSTT1	22q11.23	yes	deficiency of enzyme	tumors of the lungs, colon, neck, mouth, stomach, breast, urinary bladder, skin, urothel
GSTP1	11q13	yes	deficiency of enzyme	tumors of the lungs, urinary bladder, colon, meningeomas, astrocytomas
UGT1	2q37	yes	deficiency of enzyme	tumors of the lungs, urinary bladder, testicles, mouth, larynx
SULT1A3	16p11.2	yes	partial deficiency	Gilbert syndrome, Crigler-Najjar syndrome
				tumors of the colon and urinary bladder

CYP – cytochrome, NQO – NAD(P)H: quinone reductase, FMO – flavin-monoxygenases, EPH – epoxide hydrolase, NAT – N-acetyl transferase, GST – glutathione S-transferase, UGT – uridindiphosphate-glycosyl-transferase. SULT – sulphotransferase, SLE – systemic lupus erythematosus

Tab. 5. Charakteristika najdôležitejších enzýmov metabolizmu xenobiotík vo vzťahu ku genetickému polymorfizmu.

Enzým	Chromozóm. lokalizácia	Polymorfizmus	Funkčný následok polymorfnych alel	Vzťah polymorfizmu k ochoreniu
CYP1A1	15q22-qter	áno	rozdielna inducibilita	bronchogénne karcinómy, nádory prsníka, ústnej dutiny a hrtana
CYP1A2	15q22-qter	áno?	tri rozdielne fenotypy	nádory pečene, hrubého čreva a močového mechúra
CYP1B1	2p22-p21	áno	deficiencia enzýmu	kongenitálny glaukóm
CYP2A6	19q13.1-13.2	áno	defektný enzým	nádory nazofaryngu, vplyv na metabolizmus liečiv
CYP2A7	19q13.1-13.2	nie		
CYP2B6	19q13.1-13.2	nie		
CYP2C9	10q24.1-24.3	áno	čiasočná deficiencia	vplyv na metabolizmus liečiv
CYP2C19	10q24.1-24.3	áno	deficiencia enzýmu	vplyv na metabolizmus liečiv
CYP2D6	22q13.1	áno	množstvo fenotypových prejavov	Parkinsonov syndróm, nádory pľúc, hrtanu, močového mechúra, žalúdka, meningeómy, astrocytómy, leukémie, metabolizmus liečiv
CYP2E1	10q24.3-qter	áno	čiasočná deficiencia	nádory pľúc, nazofaryngu, hepatocelulárny karcinóm, ochorenia pečene spôsobené alkoholom, vplyv na metabolizmus liečiv
CYP2F1	19q13.1-13.2	áno	?	toxické poškodenia pľúcneho parenchýmu
CYP3A4	7q22.1	nie		
NQO1	6p25	áno	čiasočná deficiencia	nádory pľúc
FMO3	1q23-q25	áno	čiasočná deficiencia	trimethylaminouria (syndróm rybacieho zápachu)
EPH	1q42.1	áno	zníženie i zvýšenie aktivity enzýmu	nádory pľúc, hepatocelulárny karcinóm
NAT1	8p23.1-p21.3	áno?	deficiencia enzýmu	nádory hrubého čreva a močového mechúra
NAT2	8p23.1-p21.3	áno	čiasočná deficiencia	nádory pľúc, hrubého čreva a močov. mechúra, SLE, diabetes I. typu
GSTM1	1p13.3	áno	deficiencia enzýmu	nádory pľúc, hrubého čreva, krku, ústnej dutiny, žalúdka, prsníka, močového mechúra, kožné nádory, nádory urotelu
GSTT1	22q11.23	áno	deficiencia enzýmu	nádory pľúc, močového mechúra, hrubého čreva, meningeómy, astrocytómy
GSTP1	11q13	áno	deficiencia enzýmu	nádory pľúc, močového mechúra, semenníkov, ústnej dutiny, hrtanu
UGT1	2q37	áno	deficiencia enzýmu	Gilbertov syndróm, Crigler-Najjarov syndróm
SULT1A3	16p11.2	áno?	čiasočná deficiencia	nádory hrubého čreva a močového mechúra

CYP – cytochróm, NQO – NAD(P)H: chinón reduktáza, FMO – flavín-monoxygenázy, EPH – epoxidhydroláza, NAT – N-acetyltransferáza, GST – glutatión S-transferáza, UGT – uridindifosfátglykozyltransferáza, SULT – sulfoferáza, SLE – systémový lupus erythematosus

deficiencia jedného enzýmu môže byť skrytá a zastúpená prítomnosťou iného enzýmu.

Kým všeobecne enzýmy I. fázy sa považujú za aktivačné, o enzýmoch II. fázy sa hovorí ako o detoxifikačných. Mnohé súčasné štúdie však poukazujú na to, že i enzýmy II. fázy sa môžu zúčastňovať na tvorbe elektrofilných substrátov (22, 23). Preto i niektoré enzýmy II. fázy možno, pre určité špecifické chemikálie, považovať za „aktivačné“. Ako príklad možno uviesť metabolickú aktiváciu halogénových uhľovodíkov glutatión S-transferázou, či aktiváciu PAU epoxidhydrólázami alebo sulfotransferázami (tab. 3) (22). Funkcia daných enzýmov má teda *duálny charakter*, čo znamená, že môžu pôsobiť aktivačne i detoxifikačne v závislosti od substrátu a ten istý biotransformačný enzým sa môže pri určitej chemickej látke zúčastňovať na jej aktivácii, kým na inú pôsobí detoxifikačne. Z toho teda vyplýva, že napr. *slabí metabolizéri* pre určitý enzým môžu mať zvýšenú susceptibilitu k expozíciám chemikáliám, u ktorých sa daný enzým zúčastňuje na ich detoxifikácii, kým naopak, k expozíciám chemikáliám, ktoré sú tým istým enzýmom aktivované, môžu byť menej susceptibilní.

Uvedené údaje sú závažnou námietskou voči všeobecnej koncepcii, podľa ktorej by využitie inhibítorov enzýmov I. fázy alebo induktorov enzýmov II. fázy mohlo poskytovať všeobecne ochranný účinok v procese karcinogenézy (14).

Zvýšenú pozornosť treba venovať aj *vzájomným interakciám medzi jednotlivými polymorfizmami* EMX a ich produktmi navzájom. Klasickým príkladom je závislosť polymorfizmu enzýmu CYP1A1 od iných polymorfizmov. Napr. keďže enzýmy CYP2C19, resp. GSTM1 sa zúčastňujú na detoxifikácii omeprazolu, resp. oxidu benzpyrénu a obe uvedené xenobiotiká sú induktormi enzýmu CYP1A1, je zrejme, že pri deficiencii enzýmov CYP2C19 alebo GSTM1 nastáva zvýšená indukcia CYP1A1.

Hladina enzýmu CYP1A1 nezávisí len od polymorfizmu v géne CYP1A1, ale aj od polymorfizmov v génoch AHR (Ah receptor — aryl hydrocarbon receptor) a ARNT (jadrový translokátor pre Ah-receptor), ktorých produkty regulujú transkripciu CYP1A1 (19). Vzápätí však hneď treba dodať, že aktivovaný AHR komplex zasahuje i do regulácie komponentov endokrinného systému, čo poukazuje na existenciu ďalších faktorov súvisiacich s pohlavím a celkovým hormonálnym stavom, na ktoré treba prihliadať.

Polymorfizmom len v jednom, prípadne niekoľkých génoch, ktoré sa zúčastňujú na metabolizme príslušného xenobiotika, teda nemožno vysvetľovať rozdielnu individuálnu susceptibilitu k určitému nádorovému ochoreniu, ktoré je multifaktoriálnym ochorením. Hodnota rizika vzniku nádorových ochorení a jeho štatistická významnosť stúpa v závislosti od počtu rizikových faktorov, na ktoré prihliadame. Napr. pri hodnotení rizika vzniku pľúcnych nádorov súvisiaceho s „nevýhodnými“ genotypmi osobitne pre nositeľov GSTM1 0/0 a osobitne pre nositeľov CYP 1A1 Val/Val genotypov, toto riziko bolo veľmi nízke (1,2—1,6-násobné), ale keď sa skombinovali a hodnotili až tri predispozičné faktory spolu — GSTM1 0/0, CYP1A1 Val/Val a fajčenie — relatívne riziko pre vznik pľúcnych nádorov stúplo až na 21,9-násobné (10).

Ďalšie problémy pri určovaní vzťahu medzi genetickým polymorfizmom a susceptibilitou k určitému nádorovému ochoreniu môžu prameniť z faktorov *rôznej lokalizácie jednotlivých enzýmov*. Kým karcinogenéza ako proces je v podstate obdobná v rôznych tkanivách (zahŕňa mutácie v protoonkogénoch a/alebo tumor-supresorových génoch a klonálnu expanziu preneoplastických

buniek), chemické látky zúčastňujúce sa na tomto procese sú rozdielne v rôznych typoch tkaniva. To súvisí s *rozdielnou expresiou jednotlivých EMX v rôznych typoch buniek*, čo spôsobuje, že každý chemický karcinogén je obvykle (alebo výlučne) aktívny v určitom špecifickom cieľovom tkanive. Navyše i samy interakcie niektorých EMX s rôznymi substrátmi môžu byť rozdielne v závislosti od koncentrácie substrátu (1). Rozdielna aktivita chemických karcinogénov v rôznych tkanivách môže závisieť aj od spôsobu vystavenia tkanív danej expozícii (inhaláciou, potravou, absorpciou).

Uvedené faktory, ktoré sťažujú interpretáciu vzťahov medzi polymorfizmom EMX a susceptibilitou k tumorom, sú zosumarizované v tabuľke 6. Jednotlivé faktory môžu vytvárať obrovské množstvo kombinácií, či už navzájom alebo spolu s faktormi iného typu. To nám len potvrdzuje potrebu a dôležitosť dôkladnej analýzy vzájomných interakcií genotyp—genotyp a genotyp—prostredie.

Východiská, budúcnosť a perspektíva

Určítym východiskom pri tejto analýze sú rozsiahle molekulo-epidemiologické štúdie — *metaanalýzy*, ktoré pomocou vhodných štatistických metód vyhodnocujú spoločne výsledky dosiahnuté vo viacerých nezávislých štúdiách zaoberajúcich sa tým istým polymorfizmom a zhodným ochorením. Príkladmi môžu byť: metaanalýza zaoberajúca sa štúdiom vzťahu deficiencie v GSTM1 géne a rizikom vzniku pľúcnych nádorov (13), ktorá zahrnila 1593 pacientov s pľúcnyimi nádormi a 2135 kontrol; metaanalýza analyzujúca 13 štúdií skúmajúcich asociáciu CYP2D6 polymorfizmu a pľúcnych nádorov (8); či metaanalýza sumarizujúca výsledky mnohých prác, ktoré študovali vplyv GSTM1, NAT2, CYP2D6 a CYP1A1 polymorfizmov na riziko vzniku pľúcnych nádorov, nádorov močového mechúra, hrubého čreva, prsníka a ústnej dutiny v japonskej a kaukazoidnej populácii (4).

V súčasnosti prebieha i viacero *medzinárodných projektov* zaoberajúcich sa uvedenou problematikou. Jedným z nich je Environmental Genome Project (EGP), ktorý vznikol na prelome rokov 1997/1998 a jeho organizátorom je US National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). Hlavným cieľom tohto projektu je identifikácia alelických variantov (polymorfizmov) susceptibilných génov zahrnutých v etiológii tzv. „environmentálnych ochorení“ v rámci populácie USA a vytvorenie centrálnej databázy polymorfizmov týchto génov. Genotypizácia má prebehnúť u približne 1000 Američanov z piatich etnických skupín (Aziati, Afro-Američania, Hispánci, Indiáni a príslušníci kaukazoidnej populácie). Doteraz bolo do analýzy v rámci EGP zahrnutých približne 250 polymorfnných génov, ktorých produkty sa zúčastňujú na metabolizme xenobiotík (asi 100 génov), oprave poškodenej DNA (asi 50 génov), regulácii receptorovej aktivity (asi 50 génov), metabolizme živín, vitamínov a minerálov (asi 25 génov) a metabolizme steroidov (asi 25 génov). Ďalším podobným projektom je štúdia, ktorej koordinátorom je Epidemiology Unit, IRCCS na Univerzite v Miláne a NYU Medical Center v New Yorku, ktoré zhromažďujú výsledky jednotlivých prác zaoberajúcich sa genetickou susceptibilitou k environmentálnym karcinogénom. Tento projekt je zameraný hlavne na polymorfizmus v génoch kódujúcich EMX, ako napr. CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6, GSTT1, GSTM1 a NAT2. Do októbra 1998 boli zozbierané údaje

Tab. 6. Factors influencing polymorphism of xenobiotics metabolism enzymes.

Genetic factors
– Concomitance of polymorphism of EMX genes with the function or polymorphism of other indirectly coinciding genes
– coincidence of polymorphism of EMX genes with other polymorphism in other EMX (genotype-genotype interactions)
– coincidence of polymorphism of a certain EMX gene with other polymorphism of the same gene (possibility of various haplotypes)
– coincidence of polymorphism of a particular EMX gene with polymorphism of other genes regulating the expression of the given gene (CYP1A1 and AHR and ARNT genes)
– the effect of gene - dosis (the presence of two functional alelae can predispose or protect from the development of tumors to a greater extent than the presence of a single functional alela)
– sex
<i>Individual factors coinciding with the hormonal state and life style</i>
– age at carcinogenic exposition (the possible coincidence with endocrine system and hormonal state)
– coincidence of polymorphism of EMX gene with endocrine system (junction with hormonal metabolism or impact on response to hormones)
– life style (e.g. intake of antioxidants, alcohol abuse, smoking, food etc)
<i>Exposition factors</i>
– type of carcinogene (genotype - environment interaction)
– type of exposition to carcinogene (e.g. various exposition dosis, duration of exposition, dosis accumulation)
– dependence of response to the dosis (interaction of substrate with EMX can depend on the concentration of the substrate itself)
– type of carcinogene exposition in the target tissue (e.g. direct exposition by environmental amines or exposition of their metabolites in urine or via circulation)
– type of EMX present in the target tissue, their possible overlapping of substrate specificity
– dual function of a number of EMX (which can represent a susceptible genotype in one situation or a protective genotype in another)

Tab. 6. Faktory ovplyvňujúce polymorfizmus enzýmov metabolizmu xenobiotík (EMX).

<i>genetické faktory</i>
- spriahnutie polymorfizmu génov EMX s funkciou alebo polymorfizmom iných nepriamo súvisiacich génov (napr. onkogénov)
- prepojenie (súvislosť) polymorfizmu génov EMX s polymorfizmom iných EMX (interakcie genotyp – genotyp)
- súvislosť polymorfizmu určitého génu EMX s iným polymorfizmom toho istého génu (možnosť rôznych haplotypov)
- súvislosť polymorfizmu určitého génu EMX s polymorfizmom iných génov regulujúcich expresiu daného génu (CYP1A1 a AHR a ARNT gény)
- účinok gén – dávka (prítomnosť dvoch funkčných alel môže viac predisponovať, resp. ochraňovať pred vznikom tumorov ako prítomnosť len jednej funkčnej alely)
- pohlavie
<i>individuálne faktory súvisiace s hormonálnym stavom a životným štýlom</i>
- vek kedy došlo ku karcinogénnej expozícii (možná súvislosť s endokrinným systémom a hormonálnym stavom)
- súvislosť polymorfizmu génov EMX s endokrinným systémom (napr. prepojenie s metabolizmom hormónov, alebo ovplyvnením odpovede na hormóny)
- životný štýl (napr. príjem antioxidantov, užívanie alkoholu, fajčenie, strava a pod.)
<i>expozičné faktory</i>
- typ karcinogénu (interakcie genotyp – prostredie)
- typ expozície karcinogénu (napr. rôzna dávka expozície, dĺžka trvania expozície, kumulácia dávky)
- závislosť reakcie od dávky (interakcia substrátu s EMX môže závisieť od koncentrácie samotného substrátu)
- spôsob expozície karcinogénom v cieľovom tkanive (napr. priama expozícia environmentálnym arylamínom alebo expozícia ich metabolitom v moči alebo prostredníctvom cirkulácie)
- typ EMX prítomných v cieľovom tkanive, ich možné prekrývanie v substrátovej špecifickosti
- duálna funkcia mnohých EMX (čo môže byť v určitej situácii susceptibilným genotypom, v inej môže byť ochranným)

týkajúce sa daných genetických polymorfizmov u 17 860 osôb (52 % pacientov s nádorovým ochorením a 48 % kontrol). Najčastejším typom tumorov boli pľúcne nádory (4250 prípadov), nasledovali kožné nádory (996), nádory prsníkov (806), močového mechúra (537), hrubého čreva (516). U všetkých sledovaných jedincov sa okrem genotypizácie zisťujú demografické charakteristiky, ako vek, pohlavie, rasa, ale i údaje týkajúce sa expozícií, ako fajčenie, alkohol, profesionálna expozícia. V súčasnosti intenzívne prebieha analýza zozbieraných údajov. Do tohto projektu bola zahrnutá i epidemiologická štúdia skúmajúca asociáciu polymorfizmov v génoch GSTM1 a GSTT1 so susceptibilitou k vzniku nádorov močového mechúra v rámci slovenskej populácie (27).

Pri takýchto rozsiahlych molekulovo-epidemiologických štúdiách treba určiť obrovské množstvo genotypov. Za predpokladu, že pri štúdiu polygénnych ochorení je potrebné rešpektovať približne 100 000 polymorfizmov v jednotlivých nukleotidoch (SNP) (11) a ako dostatočnú vzorku by sme uvedené polymorfizmy chceli určiť u 5000 osôb, museli by sme určiť približne 500 miliónov genotypov. V súčasnosti aj to najproduktívnejšie genotypizačné laboratórium môže ročne určiť maximálne 5 miliónov genotypov. Východiskom sú technológie DNA mikročipov založené na hybridizácii komplementárnych reťazcov DNA. Jeden z reťazcov je fluorescenčne označený, čo umožňuje automatickú detekciu sekvencie hybridizovaných párov. Jednotlivé oligonukleotidy (dĺžky

20–2000 báz) su prichytené na silikónovom podklade alebo na špeciálne chemicky upravenom sklenom povrchu (napr. mikroskopické sklíčko). Genómová DNA, ktorá je fluorescenčne značená, hybridizuje s prichytenými oligonukleotidmi a nakoniec sa premýva, aby došlo k odstráneniu nenaviazaného materiálu. Výsledky sa snímajú fluorescenčným snímacím zariadením a vyhodnocujú sa počítačom, ktorý ich na základe uloženej databázy interpretuje. Na jeden mikročip veľkosti 1,5 cm² možno umiestniť až 65 000 hybridizačných sond. Wang a spol. (29) opisujú identifikáciu, mapovanie a genotypizáciu 3241 nových SNP za použitia oligonukleotidových DNA čipov zahŕňajúcich 2,3 megabázy genómovej DNA. Uvedené technológie už boli využité pri detekcii mutácii v BRCA1 géne u pacientiek s karcinómom prsníka, pri kompletizácii mitochondriálneho genómu, pri genotypizácii a identifikácii jednotlivých druhov *Mycobacterium tuberculosis* a *Saccharomyces cerevisiae* (5, 7, 24).

Záver

Ešte pred niekoľkými rokmi bol všeobecne uznávaný názor, že jeden konkrétny gén môže byť zodpovedný za vznik určitého ochorenia. Dnes si však uvedomujeme, že prakticky všetky ochorenia, na vzniku ktorých sa zúčastňujú toxické látky prostredia a rozdielna susceptibilita, sú kombinovaným prejavom tzv. „hlavných“ a „modifikujúcich“ génov. Gén BRCA1 sa spočiatku deklaroval ako „Gén“ pre rakovinu prsníkov; po objavení BRCA2 génu a po ďalších podrobných epidemiologických štúdiách však už väčšina výskumníkov v súčasnosti prijala názor, že existuje pravdepodobne asi 4–12 „hlavných“ génov a navyše množstvo „modifikačných“ génov zodpovedných za zvýšenie rizika vzniku tumorov prsníka (18). Gény enzýmov metabolizmu xenobiôtík (EMX) a gény pre receptory EMX sa nachádzajú medzi modifikačnými faktormi, ktoré môžu ovplyvniť riziko vzniku nádorových ochorení zvýšením, resp. znížením susceptibilitu k rizikovým environmentálnym expozíciám.

Je zrejmé, že žiaden marker sám neumožní dostatočne presne predpovedať riziko vzniku ochorenia. Je veľmi pravdepodobné, že do reálnej predpovede a hodnotenia tohto rizika bude nutné zahrnúť podľa možnosti všetky faktory ovplyvňujúce susceptibilitu. Túto náročnú analýzu nám už pravdepodobne v blízkej budúcnosti umožnia DNA mikročipové technológie. Objasnenie genetickej susceptibilitu k environmentálnym agensom umožní presnejšiu identifikáciu činiteľov prostredia zapríčínujúcich ochorenie a presnejšie a pravdivejšie určenie rizika vyplývajúceho z danej expozície. To napomôže k zdokonaleniu prevencie chorôb a zlepšeniu zdravia obyvateľstva. Výsledky získané v klinických, genetických a fenotypových testoch umožnia v budúcnosti susceptibilným jedincom zmeniť ich životný štýl (napr. skončiť s fajčením alebo alkoholom), aby tak mohli kompenzovať svoju geneticky predisponovanú „slabosť“, a lekárom umožnia vybrať najvhodnejšie lieky pri liečbe konkrétnych pacientov. Väčšiu pozornosť pri klinických štúdiách nových liečiv bude potrebné venovať i interindividuálnym rozdielom v rámci rôznych populácií skôr, ako budú uvedené na trh v rôznych krajinách.

Dá sa predpokladať, že zmapovanie ľudského genómu a poznanie jeho variability bude patriť v budúcich rokoch k najvzrušujúcejším a najvýznamnejším pokrokom v medicíne a prispeje k pochopeniu vzťahu medzi polymorfizmom EMX a individuálnou susceptibilitou k vzniku nádorových ochorení.

Literatúra

- Bouchardy C., Benhamou S., Dayer P.:** The effect of tobacco on lung cancer risk depends on CYP2D6 activity. *Cancer Res.*, 56, 1996, s. 251–253.
- Butterworth B.E., Popp J.A., Conolly R.B.:** Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. S. 279–305. In: Vainio H., Magee P.N., McGregor D.B. et al. (Eds.): *Mechanisms of carcinogenesis in risk identification*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, IARC Sci. Publ. No. 116, 1992.
- Daly A.K., Cholerton S., Gregory W., Idle J.R.:** Metabolic polymorphism. *Pharmacol. Ther.*, 57, č. 2–3, 1993, s. 129–160.
- d'Errico A., Taioli E., Chen X., Vineis P.:** Genetic metabolic polymorphism and the risk of cancer: a review of the literature. *Biomarkers*, 1, 1996, s. 149–173.
- Gingeras T.R., Ghandour G., Wang E.:** Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res.*, 8, 1998, č. 5, s. 435–448.
- Guengerich F.P.:** Human cytochrome P450 enzymes. S. 473–535. In: Ortiz de Montellano P.R. (Ed.): *Cytochrome P450*. New York, Plenum 1995.
- Chee M., Yang R., Hubbell E.:** Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science*, 274, 1996, s. 610–614.
- Christiansen P.M., Gotsche P.C., Brosen K.:** The sparteine/debrisoquine (CYP2D6) polymorphism and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, 51, 1997, s. 389–393.
- Kalow W.:** *Pharmacogenetics — Heredity and the Responses to Drugs*. Philadelphia, WB Saunders 1962.
- Kihara M., Kihara K., Noda K.:** Risk of smoking for squamous and small cell carcinomas of the lung modulated by combinations of CYP1A1 and GSTM1 gene polymorphisms in a Japanese population. *Carcinogenesis*, 16, 1995, s. 2331–2336.
- Lander E.S., Schork N.J.:** Genetic dissection of complex traits. *Science*, 265, 1994, s. 2037–2048.
- Lubet A.R., Dragnev K.H., Chauha P.D.:** A pleiotropic response to phenobarbital-type enzyme inducers in the F344/NCr rat. Effect of chemicals of varied structure. *Biochem. Pharmacol.*, 43, 1992, s. 1067–1078.
- McWilliams J.E., Sanderson B.J.S., Harris E.L., Richert-Boe K.E., Henner W.D.:** Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol., Biomarkers&Prev.*, 4, 1995, s. 589–594.
- Morse M.A., Stoner G.D.:** Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis*, 14, 1993, č. 9, s. 1737–1746.
- Motulsky A.G.:** *Drug reaction, enzymes and biochemical genetics*. J. Amer. Med. Ass., 165, 1957, s. 835–837.
- Nebert D.W.:** Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutat. Res.*, 247, 1991, č. 2, s. 267–281.
- Nebert D.W.:** Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. *Biochem. Pharmacol.*, 47, 1994, s. 25–37.
- Nebert D.W., Ingelman-Sundberg M., Daly A.K.:** Genetic epidemiology of environmental toxicity and cancer susceptibility: human allelic polymorphisms in drug-metabolizing enzyme genes, their functional

importance, and nomenclature issues. *Drug Metab. Rev.*, 31, 1999, č. 2, s. 467—487.

19. Nebert D.W., Mc Kinnon R.A., Puga A.: Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol.*, 15, 1996, s. 273—280.

20. Nebert D.W., Petersen D.D., Puga, A.: Human AH locus polymorphism and cancer: inducibility of CYP1A1 and other genes by combustion products and dioxin. *Pharmacogenetics*, 1, 1991, s. 68—78.

21. Nooter K., Stoter G.: Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Path. Res. Pract.*, 192, 1996, s. 768—780.

22. Paolini M., Biagi G.L., Cantelli-Forti G.: The many consequences of chemical- and genetic-based modulation of drug metabolizing enzyme activities. *Pharmacol. Lett.*, 65, 1999, č. 8, s. 75—79.

23. Seidegard J., Ekström G.: The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ. Health Persp.*, 105, Suppl. 4, 1997, s. 791—799.

24. Shoemaker D.D., Lashkari D.A., Morris D., Mittmann M., Davis R.W.: Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nature Genet.*, 14, 1996, č. 4, s. 450—456.

25. Schafer A.J., Hawkins, J.R.: DNA variation and the future of human genetics. *Nature Biotechnol.*, 16, 1998, s. 33—39.

26. Spivack S.D., Fasco M.J., Walker V.E., Kaminsky, L.S.: The molecular epidemiology of lung cancer. *Crit. Rev. Toxicology*, 27, 1997, č. 4, s. 319—365.

27. Šalagovič J., Kalina I., Habalová V., Hrivňák M., Valanský L., Biroš E.: The role of human glutathione S-transferases M1 and T1 in individual susceptibility to bladder cancer. *Physiol. Res.*, 48, 1999, s. 465—471.

28. Taningher M., Malacarne D., Izzotti A., Ugolini D., Parodi S.: Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat. Res.*, 436, 1999, s. 227—261.

29. Wang D.G., Fan J.-B., Siao, C.S. et al.: Large scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphism in the human genome. *Science*, 280, č. 5366, 1998, s. 1077—1082.

30. Wiliams R.J.: *Biochemical individuality.* New York, Wiley 1956.

Received February 25, 2000.

Accepted September 8, 2000.

Práca bola riešená v rámci grantu VEGA č. 1/6040/99.

EVOLVING ISSUES IN ONCOLOGY: WHAT IS THE 'OPTIMAL' HEMOGLOBIN LEVEL?

Oxygen and cancer — how do they fit together?

An educational symposium on improving quality of life and treatment of cancer patients

Seville, September 7th 2000 — The presence of oxygen is essential for the life of most organisms including the human being, as it is required to metabolize sugar into energy. Lack of oxygen can lead to the development of organic dysfunction resulting in severe diseases, seen in patients suffering cardiac problems. Another disease where insufficient oxygen supply is common but receives less recognition is cancer. An exciting educational symposium is now taking place in Seville, Spain, from September 7—9, 2000. More than 800 world-renowned oncologists will attend to discuss the existing links between oxygen and cancer and give a comprehensive overview. Due to the importance of the topic, this symposium has been accredited for Continuing Medical Education by the European Society of Medical Oncology (ESMO).

One of the main topics of the symposium is the fatigue syndrome resulting from tumor- or therapy-induced anemia. Nearly 80 percent of all cancer patients suffer from fatigue symptoms which can be physical (tiredness, lack of energy, weakness) but also psychological (depression, cognitive dysfunctions) ^{1,2}. "It is possible to help many of these patients by increasing their hemoglobin levels via blood transfusions or by using hematopoietic growth factors like erythropoietin", says Dr. Peter Harper, Consultant Physician and Medical Oncolo-

gist, Guy's&St. Thomas' Hospital, London, and co-chairman of the symposium, "but in contrast to the patients, many physicians don't realize fatigue as a real problem. It is therefore imperative to make doctors more aware of what fatigue means to their patients".

The fatigue problem becomes even more prominent with the use of dose-intensified chemotherapy regimes which improve therapy results, but can also lead to severe damage of erythrocyte production. As shown in several studies, this problem can be successfully circumvented by the preventional application of erythropoietin^{3,4}. The use of this substance was therefore integrated into the design of a number of new clinical trials, for example on lung and breast cancer.

Another reason for correcting anemia with erythropoietin is the possible improvement of therapy outcome by increasing the oxygenation status of tumors via improved hemoglobin levels. It has been known for many years that hypoxic tumor areas are more resistant against radiation compared to well oxygenated parts of the tumor⁵. Additionally, it could be shown for some types of tumors (e.g. head and neck tumors, cervical cancer) that low hemoglobin levels are a negative prognostic factor^{6,7}. "The improvement of cancer therapy by supplying the tumor with more oxygen is an interesting new approach in oncology", says Prof. Mario Dicato, oncologist, Centre Hospitalier de Luxembourg, and co-chairman of the symposium. "The first preliminary results are encouraging, but there is still a lot of work to be done".

Pokračovanie na s. 525