

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



MUDr. David Vrána

**Genetický polymorfismus biotransformačních enzymů a riziko vzniku
karcinomu pankreatu v České republice**

**Genetic polymorphism of biotransforming enzymes and risk of pancreatic
cancer development in Czech Republic**

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Doc. MUDr. Jan Novotný, PhD.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1.2.2011

MUDr. David Vrána

Podpis

Identifikační záznam: VRÁNA, David. Genetický polymorfismus biotransformačních enzymů a riziko vzniku karcinomu pankreatu v České republice. [Genetic polymorphism of biotransforming enzymes and risk of pancreatic cancer development in Czech Republic.], Praha, 2010, 43 stran, 1 příloha. Dizertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Onkologická klinika. Vedoucí závěrečné práce: Novotný, Jan.

Poděkování:

Rád bych tímto poděkoval svému školiteli Doc. MUDr. Janu Novotnému, PhD. za odborné vedení a cenné rady při zpracování dizertační práce a kolektivu Oddělení laboratoří toxikogenomiky ve Státním zdravotním ústavu v Praze zejména RNDr. Pavlu Součkovi, PhD.

Tato práce byla finančně podpořena granty GACR 310/07/1430 a IGA 9422-3.

V Praze dne 1.2.2011

MUDr. David Vrána

Abstrakt

Genetický polymorfismus biotransformačních enzymů a riziko vzniku karcinomu pankreatu v České republice

Úvod: Karcinom pankreatu patří díky své prognóze k jednomu z největších problémů současné onkologie. Postihuje nejčastěji pacienty v šesté a vyšší dekádě a díky minimálním příznakům v časných stádiích je diagnostikován většinou ve fázi lokálně pokročilého či metastatického onemocnění. Jedinou modalitou představující pro pacienta šanci na dlouhodobé přežívání je radikální chirurgická resekce. Chemoterapie i možná cílená léčba má pouze paliativní charakter. Vzhledem k tomu by bylo nanejvýš užitečné identifikovat takové genetické faktory, predisponující ke vzniku karcinomu pankreatu a vytvořit jakýsi skriningový program s cílem záchytu časných stádií. V naší práci jsme se zaměřili na polymorfizmy v biotransformačních enzymech, které ovlivňují metabolismus karcinogenů a prokarcinogenů a mohly představovat riziko karcinomu pankreatu.

Metodika: Do naší studie bylo zařazeno 278 pacientů s karcinomem pankreatu. Jako kontrolní skupinu jsme použili skupinu zdravých dobrovolníků z ambulancí praktických lékařů a transfuzních stanic. Zaměřili jsme se na studium polymorfizmů biotransformačních enzymů CYP1B1, EPHX, NQO1, GSTP1, GSTT1, GSTM1. DNA byla amplifikována PCR, následně štěpena restrikcími enzymy a velikost restrikcí produktů stanovena horizontální elektroforézou na agarózovém gelu. Statistická analýza byla zpracována pomocí statistického softwaru CRAN 2.4.0. Celkové přežívání daných skupin a podskupin bylo stanoveno pomocí Kaplan-Maierovy distribuční funkce. Pro hodnocení rozdílu přežívání mezi jednotlivými studovanými skupinami byl použit log-rank test. Odds ratio (odhad relativního rizika) a konfidenční intervaly pro stanovení vztahu mezi polymorfizmy a rizikem karcinomu pankreatu byly stanoveny logistickou regresí.

Výsledky: Hodnocení distribuce alel mezi případy a kontrolami ukázalo, že nosiči genotypu Val/Val v kodonu 432 genu CYP 1B1 mají nižší riziko než nosiči divoké alely (OR 0,59, 95%CI 36-0,96, $p=0,035$). Heterozygoti měli rovněž riziko nižší (OR 0,69, 95%CI 0,49-0,97, $p=0,033$). V případě analýzy histologicky verifikovaných případů byl nalezen ještě signifikantnější vztah. Variantní alela v GSTP1 kodonu 105 byla spojena se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu pankreatu (OR 1,38, 95%CI 0,96-1,97), stejně tak delece v GSTT1 představovala zvýšené riziko (OR 1,56, 95%CI 0,93-2,61), kombinace null genotypu v GSTT1 a variantní alely v kodonu 105 GSTP1 dále riziko zvyšovalo (OR 2,5, 95% CI 1,20-5,20). V ostatních polymorfizmech nebyl nalezen statisticky signifikantní vztah. Stejně tak nebyl nalezen signifikantní vztah studovaných polymorfizmů a délkou přežívání pacientů s karcinomem pankreatu.

Závěr: Naše studie byla první takovou studií v České republice, je třeba dalších dat a větších souborů pacientů k potvrzení nalezených asociací polymorfizmů v biotransformačních enzymech a rizikem karcinomu pankreatu.

Abstract

Genetic polymorphism of biotransforming enzymes and risk of pancreatic cancer development in Czech Republic

Objective: Pancreatic cancer represents one of the biggest challenges of present-day oncology. It affects mainly elderly patients in sixth or higher decade of life and due to minimal symptoms in early stages, it is usually diagnosed in locally advanced or metastatic stage of the disease. The only modality which represents a possible chance for long term survival is radical surgical resection. Chemotherapy and possible targeted therapy have only a palliative role. Due to the above mentioned facts, it would be highly useful to identify genetic factors, which could play a role in pancreatic cancer development and create specific screening program which could identify early stages of the disease. We have focused our study on gene polymorphisms in biotransforming enzymes, which modify carcinogen and procarcinogen metabolism and may represent risk factors for pancreatic cancer.

Methods: We have included 278 pancreatic cancer patients into this study. As a control group we have chosen healthy volunteers from general practitioner clinics and healthy blood donors. We have focused on gene polymorphisms in biotransforming enzymes CYP1B1, EPHX, NQO1, GSTP1, GSTT1, GSTM1. DNA was amplified by PCR, consequently split by restriction enzymes and the restriction fragment size was identified by horizontal electrophoresis. Statistical analyses were processed by the statistical software CRAN 2.4.0. The overall survival of given groups was determined using Kaplan-Meier's survival distribution functions. The Log-rank test was used for evaluation of different survivals among investigated groups and subgroups. Odds ratios (OR) and confidence intervals for examining the association between genetic factors and cancer risk were estimated by logistic regression.

Results: Allele distribution assessment between cases and controls showed, that Val/Val genotype carriers in codon 432 CYP1B1 have lower risk of pancreatic cancer development than wild type carriers (OR 0,59, 95%CI 0,36-0,96, p=0,035). Heterozygotes have also lower risk (OR 0,69, 95%CI 0,49-0,97, p=0,033). There was an even more significant relation in the case of histologically verified patients. Variant allele in GSTP1 codone 105 was associated with higher pancreatic cancer risk (OR 1,38, 95%CI 0,96-1,97), the same was found for GSTT1 deletion (OR 1,56, 95%CI 0,93-2,61). The combination of GSTT1 and GSTP1 had a multiplicative effect on the risk for pancreatic cancer (OR 2,5, 95% CI 1,20-5,20). There was no statistically significant relation in other gene polymorphisms. Also there was no association found between studied gene polymorphisms and pancreatic cancer survival.

Conclusion: Our study was the first of its kind in The Czech Republic and further research is needed to confirm the above mentioned gene polymorphisms associations with pancreatic cancer risk and survival.

OBSAH

Seznam použitých zkratek

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Karcinom pankreatu

1.2 Standardní terapie karcinomu pankreatu

1.3 Molekulární změny u karcinomu pankreatu

1.4 Polymorfismus v biotransformačních enzýmech

2 CÍL PRÁCE

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Chemikálie

3.2 Izolace DNA z krve

3.2.1 Fenol-chloroformová extrakce

3.2.2 Izolace DNA magnetickými partikulami

3.3 Analýzy genotypu

3.3.1 Polymerázová řetězová reakce a restrikční analýza délky fragmentů

3.4 Subjekty hodnocení

4 STATISTICKÁ ANALÝZA

5 VÝSLEDKY

6 DISKUZE

7 PUBLIKACE

8 LITERATURA

9 PŘÍLOHY

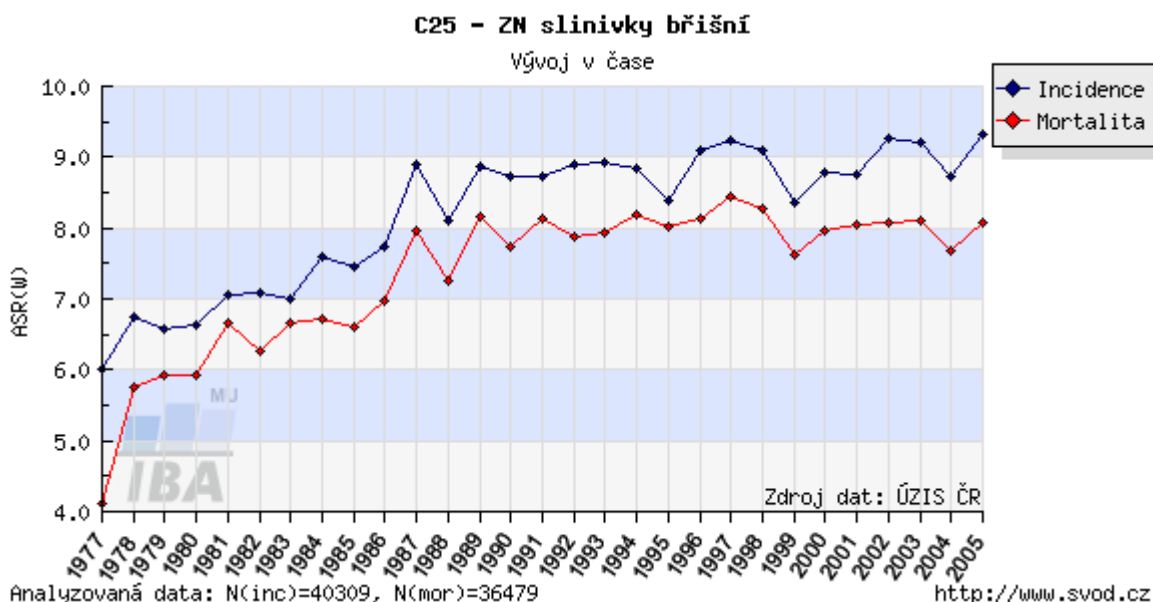
Seznam použitých zkratek

CI 95%	95% interval spolehlivosti
CYP	cytochromy P450
cDDP	cisplatina
CDKN	inhibitor cyklin-dependentních kináz (též p16)
dNTP	deoxynukleosidtrifosfáty
EPHX1	mikrozosomální epoxidhydroláza 1
GST	glutathion-S-transferáza
HNPCC	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
MQ	ultračistá voda připravená přístrojem Biocel A10 od firmy Millipore Corp. (Billerica, MA, USA)
TP53	tumor supresorový gen kódující protein p53
NQO1	NAD(P)H: chinonoxidoreduktáza 1
PCR	polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)
RFLP	restrikční analýza délky fragmentů („restriction fragment length polymorphism“)
SDS	laurylsulfát sodný
STK11	serin/threonin kináza
5-FU	5-fluorouracil

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Karcinom pankreatu

Karcinom pankreatu představuje díky své prognóze jeden z největších problémů současné onkologie. Ačkoliv incidence tohoto onemocnění v České republice kontinuálně roste (graf 1.), je známo velice málo o rizikových faktorech predisponujících pro vznik karcinomu pankreatu, stejně tak o faktorech ovlivňujících prognózu tohoto onemocnění. Dle údajů Národního onkologického registru činila incidence karcinomu pankreatu v České republice v roce 1980 6,6 na 100 000 obyvatel, avšak v roce 2005 již 9,6 na 100 000 [1].



Graf 1: Vývoj incidence a mortality karcinomu pankreatu v čase v České republice

Po nádorech plic a tlustého střeva je karcinom pankreatu třetím v příčinách úmrtí na nádorová onemocnění mužů mezi 35 až 54 roky. Postihuje nejčastěji generaci páté a vyšší dekády. Jedinou terapeutickou možností, která pacientovi přináší šanci na dlouhodobé přežití je radikální chirurgická resekce, která však již často není možná, jelikož většina pacientů je diagnostikována v lokálně pokročilém či metastatickém stádiu onemocnění (tabulka 1., graf 2.). V neresekabilním stádiu je možností paliativní chemoterapie (nejčastěji se používá

gemcitabin, 5-fluorouracil, cisplatina, kapecitabin). Průměrná doba přežití u pacienta s resekabilním stádiem onemocnění je pouze šest měsíců. Vzhledem k lokalizaci karcinomu u 75% nemocných v hlavě pankreatu je nejčastější první manifestací onemocnění obstrukční ikterus, dalšími příznaky jsou váhový úbytek, bolesti v oblasti epigastria nebo migrující tromboflebitida [2], [3].

Tabulka 1.: Stádia onemocnění karcinomu pankreatu dle TNM klasifikace [4] :

Tis	N0	M0	Stádium 0
T1	N0	M0	Stádium IA
T2	N0	M0	Stádium IB
T3	N0	M0	Stádium IIA
T1,2,3	N1	M0	Stádium IIB
T4	Jakékoliv N	M0	Stádium III
Jakékoliv T	Jakékoliv N	M1	Stádium IV

T klasifikace

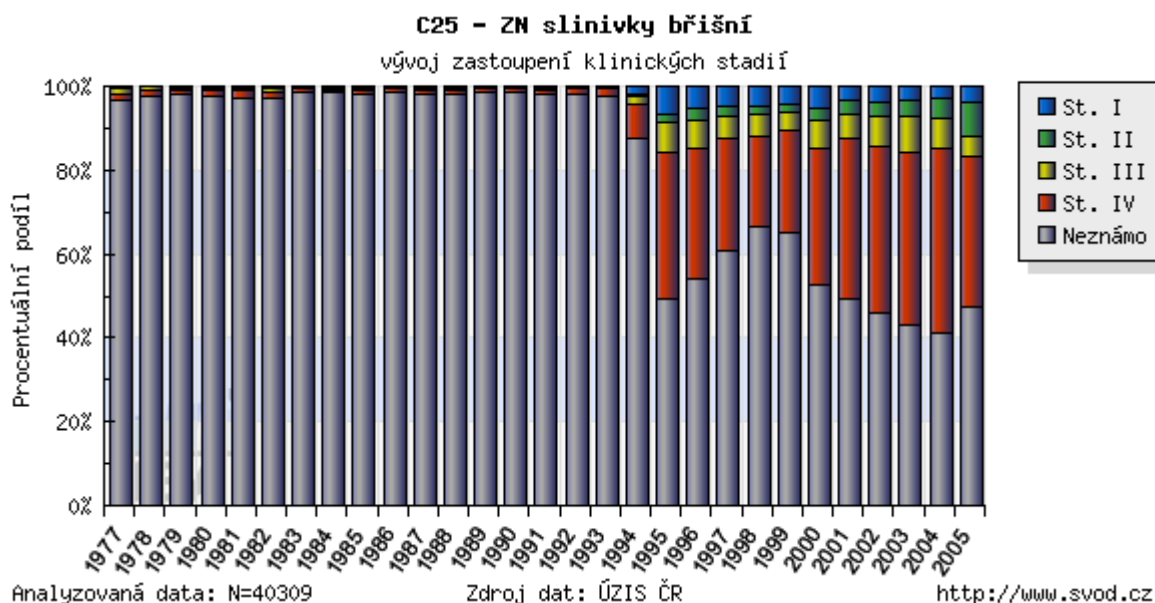
Tis	karcinom in situ
T1	nádor omezen na pankreas, 2cm nebo méně v největším rozměru
T2	nádor omezen na pankreas, větší než 2 cm v největším rozměru
T3	nádor se šíří mimo pankreas, nepostihuje však truncus coeliacus nebo a. mesenterica superior
T4	nádor postihuje truncus coeliacus nebo a. mesenterica superior

N klasifikace

N0	v regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy
N1	metastázy v regionálních mízních uzlinách

M klasifikace

M0	nejsou vzdálené metastázy
M1	vzdálené metastázy přítomny



Graf 2: Vývoj zastoupení klinických stádií v čase [1]

Jedním z důležitých problémů karcinomu pankreatu je skutečnost, že neexistují markery časného záchytu onemocnění. Tumorové markery jsou značně nespecifické a klinicky se využívají spíše při hodnocení léčebné odpovědi na chemoterapii (CA 19-9). Proto jsme se soustředili na možnost najít takové genetické polymorfizmy, které by mohly souviset se vznikem karcinomu pankreatu a eventuálně predikovat odpověď na léčbu. První skupina nových molekulárních markerů by tak mohla být využita k definování skupiny osob vhodné pro sekundární preventivní programy, druhá pak k individualizaci léčebných postupů.

1.2 Standardní terapie karcinomu pankreatu [5]

Jedinou léčbou, kterou lze dosáhnout dlouhodobé přežívání pacienta je radikální resekce tumoru, ta je možná v I. a II. stádiu onemocnění, kdy je tumor omezen na pankreas. Základním operačním výkonem je Whippleova operace (hemipankreatikoduodenectomie) s resekcí nebo bez resekce vena mesenterica superior. U nádorů postihující tělo pankreatu je prováděna totální pankreatektomie a v případě postižení kaudy pankreatu distální pankreatektomie. Po radikální

resekci obvykle následuje adjuvantní chemoterapie s 5-fluorouracilem. U inoperabilních nádorů přichází v úvahu paliativní chemoradioterapie 5-fluorouracilem nebo paliativní chemoterapie s gemcitabinem. Paliativní chemoterapie gemcitabinem je standardní léčbou u generalizovaného onemocnění obvykle po zajištění drenáže žlučových cest (tabulka 2.). Nově se do léčby dostává cílená léčba erlotinibem.

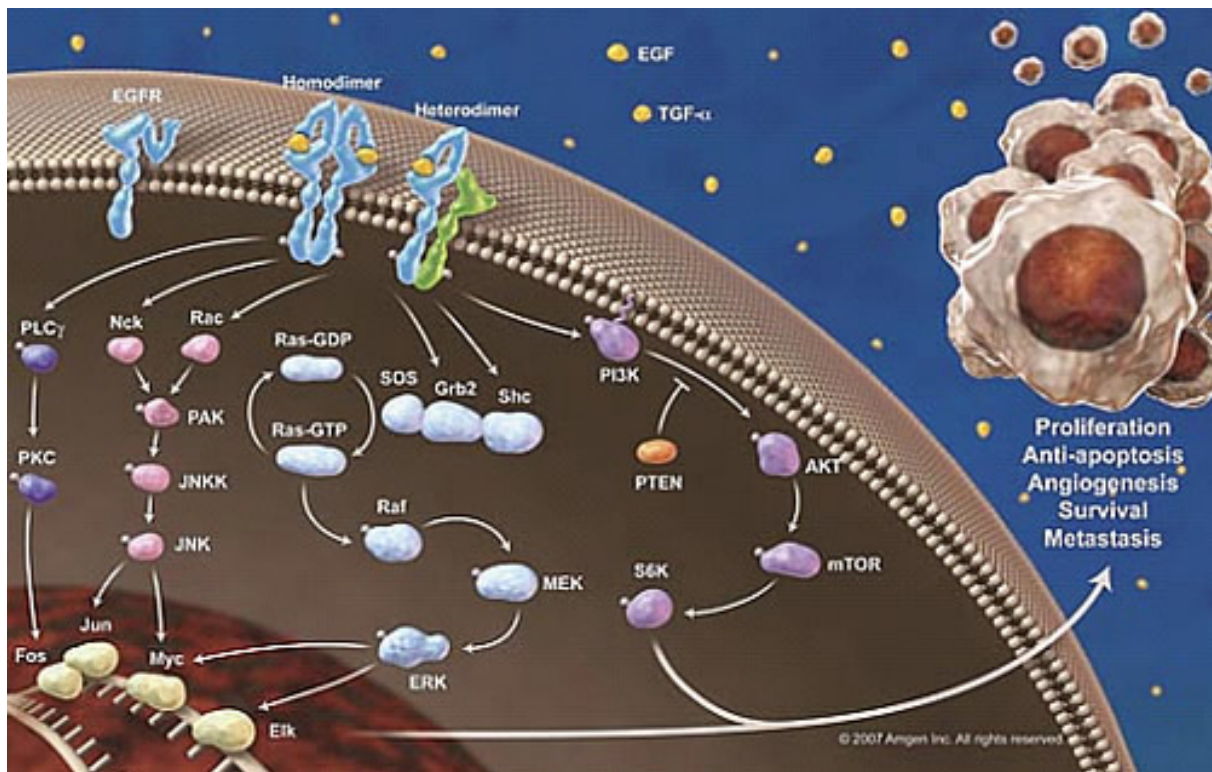
Tabulka 2.: Základní chemoterapeutické režimy používané v léčbě karcinomu pankreatu

	dávka (mg/m²)	způsob podání	den podání	opakování cyklu
adjuvantní chemoterapie				
leukovorin	25	i.v. bolus	1.–5.	à 4 týdny , 6×
5-FU	425	i.v. bolus	1.–5.	à 4 týdny , 6×
gemcitabin	1000	i.v. 30 min.	1., 8.,15.	1× za 4 týdny, 6×
chemoradioterapie				
5-FU	400 mg	i.v. bolus	1.–4. a 17.–20. den ozařování	
nebo	celková dávka			
5-FU	225	kont. inf.	každý ozařovací den	
paliativní chemoterapie 1. linie				
gemcitabin	1000	30 min infuze	1., 8., 15.	à 4 týdny do progresse
gemcitabin	1000	30 min infuze	1., 8., 15., 22.	à 4 týdny do progresse
+ erlotinib	100	per os	denně 1×	

1.3 Molekulární změny u karcinomu pankreatu

Přibližně u 4-16 % nemocných je pozorován rodinný výskyt karcinomu slinivky břišní. Genetická predispozice je dána mutací protoonkogenů, tumorsupresorových genů nebo genů podílejících se na opravě poškozené DNA. K první skupině patří rodina protoonkogenů K-ras (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog), lokalizovaná na chromosomu 12, která kóduje protein s GTPázovou aktivitou , který se podílí na přenosu informace v buňce z plazmatické membrány

(EGFR receptoru) do buněčného jádra, kde reguluje transkripci DNA. Mutace způsobí trvalou aktivaci proteinu a tím trvalou stimulaci buněčné transkripce (obr.1) [6].



Obr.1: přenos signálu zprostředkovaný K-ras proteinem

Aktivující mutace K- ras onkogenu kodonu 12 patří k nejčastějším mutacím, které je možné prokázat u karcinomu pankreatu stejně jako u duktální hyperplazie, která je považována za prekancerózu [7]. Prevalence této mutace u karcinomu pankreatu je udávána mezi 70-90 % případů [8], [9], [10]. Dalšími častými mutacemi jsou mutace v kodonu 13 a 61. Ke skupině produktů tumor supresorových genů patří protein p 16, který je kódován genem MTS1 a jeho funkcí je inhibice komplexu cyclin D/cyklindependentní kinázy-4. Deleční mutace tohoto genu je přítomna až v 85 % případů adenokarcinomu pankreatu [11]. Mutace genu BRCA 1 a 2, tumor supresorových genů lokalizovaných na genu 17 jsou nejčastěji dávány do souvislosti s rizikem vzniku karcinomu prsu a ovaria. Nosiči mutace v genu BRCA 2 mají však 3,5x vyšší riziko vzniku i karcinomu pankreatu [12]. Dalším predisponujícím faktorem karcinomu pankreatu je autozomálně dominantně dědičná hereditární pankreatitida, onemocnění způsobené mutací v genu

PRSS1 pro trypsinogen a klinicky se nejčastěji projevující opakovanými atakami akutní pankreatitidy [13]. Nosiči mutace PRSS1 mají 50-60x vyšší riziko vzniku karcinomu pankreatu. [14]. Peutz-Jaghersův syndrom je autozomálně dominantně dědičné onemocnění způsobené mutací genu STK11, který se podílí na opravě poškozené DNA a představuje také zvýšené riziko karcinomu pankreatu [15].

1.4 Polymorfismus v biotransformačních enzimech

Polymorfizmem se všeobecně označuje alelická varianta, která se vyskytuje v populaci alespoň v 1%. Vyskytují se v kódujících (exony) i v nekódujících (introny) oblastech genomu. Přítomnost polymorfizmu v exonech může způsobit změny v aminokyselinových sekvencích proteinových molekul a následně ovlivnit funkci těchto pozměněných proteinů. Polymorfizmy v nekódujících oblastech pak mohou ovlivnit sílu transkripce, sestřih nebo stabilitu messengerové RNA.

1.4.1 Cytochrom P450

Systém cytochromu P450 je zodpovědný obecně za monooxygenace, probíhající převážně ve formě inkorporace jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu, jejímž výsledkem je vznik hydroxylovaného, lépe rozpustného, produktu. Označení P450 je dle absorpčního pásu při 450 nm užívaného ke stanovení koncentrace proteinu. Cytochromy P450 (CYP) patří do rodiny hemoproteinů a jsou obsaženy v membránách endoplazmatického retikula jater, ledvin a dalších orgánů. Mitochondriální systém cytochromu P450 se od mikrozomálního liší tím, že používá NADPH-dependentní flavoprotein, adrenodoxinreduktázu, a protein obsahující nehemové Fe-S, adrenodoxin.

1.4.2 Epoxidhydroláza

Mikrozomální enzym epoxidhydroláza (EPHX1) je enzym účastnící se II. fáze biotransformace epoxidů (mezi něž patří řada karcinogenů, např. polycyklické aromatické uhlovodíky) [16], [17], [18].

1.4.3 Glutathiontransferázy

Glutathion-S-transferázy (GST) katalyzují konjugaci elektrofilních molekul s glutathionem (γ -glutamylcysteinylglycin) za vzniku kyseliny merkapturové, která je z organismu vylučována močí [19]. Savčí cytoplazmatické GST jsou podle aminokyselinové sekvence rozděleny do tříd: α (GSTA), μ (GSTM), π (GSTP), κ (GSTK), ω (GSTO), θ (GSTT), σ (GSTS) a ζ (GSTZ).

1.4.4 NQO1

NAD(P)Hchinonoxidoreduktáza (NQO1) katalyzuje redukci chinonů na hydrochinony dvouelektronovým mechanismem. Mutace v tomto genu byly asociovány s tarditivní dyskinesí, Alzheimerovou chorobou a řadou nádorových onemocnění. Enzym NQO1 se skládá z 273 aminokyselin. Základní funkcí v organismu je detoxikovat chinony dvouelektronovým přenosem na hydrochinony, které jsou dále z organismu vyloučeny po konjugaci s glutathionem nebo UDP glukuronovou kyselinou (metabolismus fáze II). Substráty pro NQO1 jsou např. benzochinony, naftochinony, které jsou součástí cigaretového kouře a také řada chemoterapeutik jako adriamycin, daunomycin, mitomycin C. Například polymorfismus v kodonu 187, měnící prolin na serin, snižuje aktivitu enzymu, a zvyšuje expozici organismu karcinogenům. Současně se předpokládá, že snížená aktivita enzymu sníží metabolismus neaktivních chemoterapeutik na jejich aktivní formy a tudíž zhorší odpověď organismu na onkologickou léčbu [20].

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

- 1) primárním cílem mé práce bylo zjistit, zda vybrané polymorfizmy biotransformačních enzymů modifikují riziko vzniku karcinomu pankreatu v české populaci.
- 2) sekundárním cílem bylo studovat prognostický význam vybraných polymorfizmů u nemocných s karcinomem slinivky břišní.
- 3) posledním cílem bylo vyhodnotit relativní váhu jednotlivých epidemiologických faktorů, které jsou považovány za rizikové ve vztahu ke vzniku karcinomu pankreatu.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly v analytické kvalitě.

3.2 Izolace DNA z krve

Vzorky krve pacientů a kontrol byly odebírány do vakuových odběrových zkumavek Vacuette (Dialab, Praha). Pro izolaci DNA byly použity dvě metody, a to fenol chloroformová extrakce a izolace magnetickou separací. Vzorky z transfuzních stanic byly zpracovány fenol chloroformovou extrakcí, vzorky karcinomu pankreatu a vzorky kontrol z ambulance praktického lékaře pomocí magnetických partikulí přístrojem KingFisher .

3.2.1 Fenol-chloroformová extrakce [21]

DNA kontrolní skupiny z transfuzního oddělení byla izolována pomocí fenol/chloroformové extrakce z lymfocytů metodou podle Sugimury.

Zamražená krev byla po roztátí lyzována na rotačním ekstraktoru po přidání lyzačního pufru. Následovala centrifugace. Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována se 4 ml sterilní Mili-Q vody (MQ) a následovala opět centrifugace při 6000 RPM a 5°C a supernatant byl opět odstraněn. Postup byl opakován s dalšími 4 ml MQ dokud peleta lymfocytů nebyla bílá. K lymfocytům bylo přidáno 800 µl pufru pro proteinázu a resuspendováno, dále bylo přidáno 25 µl proteinázy, 100 µl 10% SDS, 1 ml 5 M NaCl a 2,4 ml sterilní MQ (Mili Q), vše bylo opět promícháno 10 minut na rotačním ekstraktoru. Do každé zkumavky bylo ještě přidáno 2,5 ml extrakční směsi fenol/chloroform (v poměru 1:1) a vzorky byly opět promíchávány 15 minut na rotačním ekstraktoru. Poté byly vzorky centrifugovány 15 min. při 6000 RPM a 5°C. Vrchní čirá fáze obsahující DNA byla přenesena do čisté 15 ml centrifugační zkumavky se 4 ml 99 %

chlazeného ethanolu, kde se za opatrného promíchávání vytvořil precipitát DNA. DNA byla srážena v mrazicím boxu při -20°C přes noc. Poté byla DNA centrifugována 15 min. při 6000 RPM 5°C, supernatant byl odstraněn a DNA byla promyta 1 ml vychlazeným 70% ethanolem a centrifugována 15 min. při stejných podmínkách. Po odstranění supernatantu byla DNA sušena při pokojové teplotě. Vysušená peleta byla rozpouštěna v 1 ml sterilní MQ několik hodin a poté byla změřena koncentrace získané DNA.

3.2.2 Izolace DNA magnetickými partikulami [21]

Pro izolaci DNA z krve pacientů s nádorem pankreatu a kontrolní skupiny z ambulance praktického lékaře byl použit přístroj KingFisher (Thermo electron corporation, Vantaa, Finsko) a kit BioSprintTM. Metoda je založena na adsorpci makromolekul DNA na křemíkový povrch magnetických partikulí.

Magnetické částice s navázanou DNA jsou promyty dvěma různými pufrů, sušeny proudem vzduchu a v konečném kroku je DNA eluována do roztoku. Metoda je optimalizována na 1ml krve s maximální kapacitou přístroje 15 vzorků. Pro každý vzorek je do přístroje umístěna plastová tuba s pěti navzájem spojenými zkumavkami.

3.3 Analýza genotypu

Genotypování obou skupin subjektů bylo provedeno pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR – „Polymerase Chain Reaction“) s následnou restrikční analýzou délky fragmentů (RFLP – „Restriction Fragment Length Polymorphism“) (tabulka 3.).

Tabulka 3.: Laboratorní podmínky PCR

REAKČNÍ SMĚS	konc.
DNA	2ug/100ul
H ₂ O (MQ)	
10x buffer Top-bio (complete)	1x
MgCl ₂ Top-bio	1.8mM
dNTP Invitek	0.2mM
Oligo -primer	0.25mM
RedTaq polymerase TopBio	0.5 u/s

Pro PCR reakci byl použit termocykler GeneAmp PCR Systém 9700 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), následovala horizontální elektroforéza ve 3% gelu a délka fragmentů byla stanovena pomocí markeru Phi174/HaeIII.

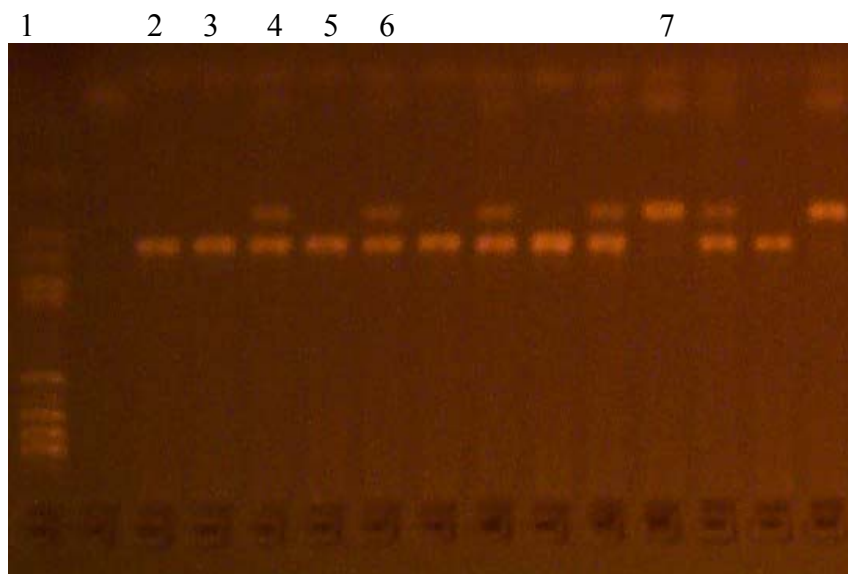
RFLP je založena na použití enzymů tzv. restrikčních endonukleáz, které rozeznávají specifickou sekvenci bází amplifikovaného PCR úseku a štěpí ji (tabulka 4., 5.).

Tabulka 4.: Obecné podmínky restrikce

REAKČNÍ SMĚS	
PCR směs	15 µl/l
Restrikční enzym	1 - 2 U/vzorek
10x Restrikční pufr	2 ml /vzorek
MQ	

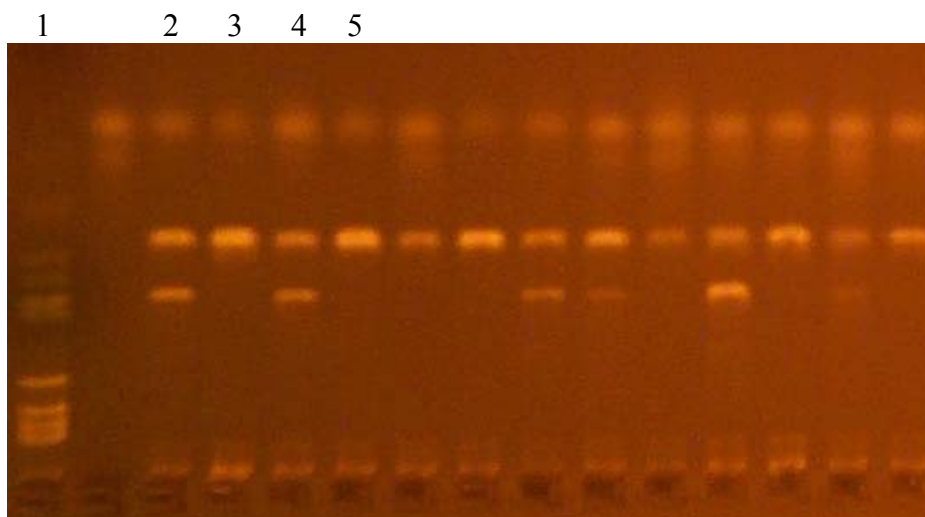
Restrikce probíhala při 37°C nebo 55°C po dobu 2 hodin, následovala opět horizontální elektroforéza na 3% agarózovém gelu a po obarvení ethidium bromidem byl výsledek vyfocen na UV transluminátoru. Velikost fragmentů byla stanovena pomocí Phi174/HaeIII.

NQO1



1 – marker Phi174/HaeIII; 4,6 – heterozygot, 2,3,5-divoký homozygot, 7-variantní homozygot

GSTM1



1 – marker Phi174/HaeIII; 3, 5 – GSTM1-null; 2, 4 – GSTM1-plus

3.4 Subjekty hodnocení

Vztah polymorfizmů k riziku vzniku karcinomu pankreatu byl zkoumán na studii případů a kontrol. Nábor subjektů hodnocení začal v září 2004 a trvá nepřetržitě dodnes. Nábor subjektů hodnocení pro tuto práci byl dokončen v únoru 2008. Poslední follow up v rámci kompletnosti dat byl uskutečněn v listopadu 2008. Celkově bylo k výše uvedenému datu do studie zařazeno 754 subjektů zahrnujících případy i kontroly. Případy byly rekrutovány z pěti klinických pracovišť lokalizovaných v Praze, Příbrami, Liberci, Rakovníku a Zlíně.

Pacienti byli zařazeni do studie v případě, že splnili alespoň jedno z následujících vstupních kritérií:

- 1) pacienti s histologicky nebo cytologicky verifikovaným adenokarcinomem pankreatu
- 2) pacienti, kteří měli alespoň 3 z následujících klinických známek nádoru slinivky břišní: anorexie/kachexie, obstrukční ikterus, na CT/MR detekovatelný tumor v pankreatu, endoskopickou ultrasonografií prokázán tumor pankreatu, elevace tumorových markerů, váhový úbytek, rychlá klinická progresse onemocnění.

Ve studii genetických polymorfizmů, byly vždy zvlášť hodnoceny skupiny histologicky verifikovaných pacientů a pacientů s klinickou diagnózou.

Další podmínkou účasti ve studii byl věk alespoň 18 let a podpis informovaného souhlasu (příloha 1). Každý účastník hodnocení byl podrobně seznámen s cílem, procedurami studie a právy účastníků studie a dal souhlas se svojí účastí.

Kontroly byly vybírány tak, aby měly podobnou věkovou distribuci a pohlaví. Ve studii jsme použili dvě kontrolní skupiny. První skupinou byli zdraví dobrovolníci z ordinací praktického lékaře, podstupující pravidelnou lékařskou prohlídku. Druhou skupinou byli zdraví dárce krve.

Data o pacientech byla průběžně shromažďována jednak z dotazníků (příloha 1.), které byly s pacientem vyplněny při osobním rozhovoru a z lékařské dokumentace, spolu s údaji o přežívání.

Follow up perioda, kdy data byla opětovně aktualizována byla 6 měsíců. Pro shromažďování dat o pacientech byla vytvořena online databáze: <https://.programy.koc.cz>

Databáze obsahuje elektronickou verzi dotazníku a klinická data. Všechny vzorky jsou zadávány v zakódované formě tak, aby nebylo možné zjistit totožnost pacienta a kontroly. Hlavním důvodem k vytvoření této online databáze bylo zajistit práci zúčastněných vždy s maximálně aktuálními daty a zajistit i okamžité zpřístupnění průběžně doplňovaných dat všem členům týmu.

Studie byla schválena etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Navíc byla studie schválena etickými komisemi jednotlivých pracovišť, na kterých probíhal nábor pacientů.

4 STATISTICKÁ ANALÝZA

Statistická analýza byla zpracována pomocí statistického softwaru CRAN 2.4.0. Celkové přežívání daných skupin a podskupin bylo stanoveno pomocí Kaplan-Maierovy distribuční funkce. Pro hodnocení rozdílu přežívání mezi jednotlivými studovanými skupinami byl použit log-rank test. Odds ratio (odhad relativního rizika) a konfidenční intervaly pro stanovení vztahu mezi polymorfizmy a rizikem karcinomu pankreatu byly stanoveny logistickou regresí.

5 VÝSLEDKY

HOLCATOVA I, SOUCEK P, VRANA D, SLAMOVA A, SCHEJBALOVA M, STRNAD R, BRABEC M, RYSKA M, Nádory slinivky břišní II, Praktický lékař, 2008, 88, č. 8

První předběžné statistické hodnocení souboru bylo provedeno v prosinci 2007 a uveřejněno v časopise Praktický lékař v roce 2008. Z výsledku vyplývá, že hrubý odhad relativního rizika (crude odds ratios) se neliší mezi skupinami kontrolních subjektů a klinicky potvrzených případů pro polymorfismus v genech *CYP1B1*, *NQO1*, *GSTP1*, *EPHX* (předběžné výsledky polymorfismu *EPHX* byly následně vyvráceny při analýze většího souboru pacientů) a *GSTT1*. Hodnocení epidemiologických dat, týkajících se především životního stylu, nepřineslo statisticky významné výsledky. Statisticky stoupá riziko onemocnění s věkem a současně jsme zaznamenali mírný rozdíl ve výskytu nádoru z hlediska věku a pohlaví. U mužů vzestup začíná již ve středním věku (od cca 40 let). U žen jsme vzestup zaznamenali až po 50. roce života. Samotný vliv pohlaví nebyl statisticky signifikantní.

VRANA D, NOVOTNY J, HOLCATOVA I, HLAVATA I, SOUČEK P. CYP1B1 gene polymorphism modifies pancreatic cancer risk but not survival, Neoplasma. 2010;57(1):15-9.

V další publikaci jsme se zaměřili na vztah mezi polymorfismy v *CYP1B1* a rizikem vzniku karcinomu pankreatu. Hodnocení distribuce alel mezi případy a kontrolami ukázalo, že nosiči genotypu Val/Val v kodonu 432 mají nižší riziko než nosiči divoké alely (OR 0,59, 95%CI 0,36-0,96, p=0,035). Heterozygoti měli rovněž riziko nižší (OR 0,69, 95%CI 0,49-0,97, p=0,033). V případě analýzy histologicky verifikovaných případů byl nalezen ještě signifikantnější vztah. Na druhou stranu jsme nenalezli žádný vztah mezi polymorfismy v kodonu 453 a rizikem vzniku karcinomu pankreatu. Celkové přežívání pacientů s wild-type genotypem v kodonu 453 i 432 bylo delší, ale výsledek nebyl statisticky signifikantní.

VRANA D, PIKHART H, MOHELNIKOVA-DUCHONOVA B, HOLCATOVA I, STRNAD R, SLAMOVA A, SCHEJBALOVA M, RYSKA M, SUSOVA S, SOUCEK p., The association between glutathione S-transferase gene polymorphisms and pancreatic cancer in a central European Slavonic population, Mutat Res-Gen Tox Environm Mutag 2009;680:78–81.

V následující publikaci jsme sledovali asociaci mezi rizikem vzniku karcinomu pankreatu a polymorfizmy v genech *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1*. Zjistili jsme, že variantní alela v *GSTP1* kodonu 105 byla spojena se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu pankreatu (OR 1,38, 95%CI 0,96-1,97), stejně tak delece v *GSTT1* představovala zvýšené riziko (OR 1,56, 95%CI 0,93-2,61), kombinace null genotypu v *GSTT1* a variantní alely v kodonu 105 *GSTP1* dále riziko zvyšovalo (OR 2,5, 95% CI 1,20-5,20).

MOHELNIKOVA-DUCHONOVA B, VRANA D, HOLCATOVA I, RYSKA M, SMERHOVSKY Z, SOUCEK P., CYP2A13, ADH1B, and ADH1C Gene Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk, Pancreas. 2010;39(2):144-148.

V této publikaci jsme studovali, zda polymorfizmy v genech podílejících se na metabolismu karcinogenů, vznikajících při hoření tabáku a polymorfizmy v genech metabolizující alkohol mají vztah k riziku karcinomu pankreatu. Konkrétně jsme studovali *CYP 2A13* (Arg101Stop) a dále *ADH1B* (Arg48His) a *ADH1C* (Ile350Val). Z výsledků plyne, že studované polymorfizmy v *ADH1B* ani *ADH 1C* nepředstavovaly zvýšené riziko vzniku karcinomu pankreatu. Stejně tak jsme nenalezli signifikantní vztah polymorfizmu *CYP 2A13* ke karcinomu pankreatu (variantní alela kódující inaktivní enzym byla přítomna pouze v 7 případech pacientů a u žádné kontroly).

NACCARATI A, PARDINI B, POLAKOVA V, SMERHOVSKY Z, VODICKOVA L, SOUCEK P, VRANA D, HOLCATOVA I, RYSKA M, VODICKA P Genotype and haplotype analysis of TP53 gene and the risk of pancreatic cancer: an association study in the Czech Republic., Carcinogenesis. 2010;31(4):666-70.

Ve výše uvedené publikaci bylo studováno riziko vzniku karcinomu pankreatu a genu TP 53 jako základního regulačního prvku buněčného cyklu. Mutace v TP53 jsou nalézány v řadě tumorů, v nichž mutace způsobí inaktivaci genu a tím umožní zpuštění karcinogeneze. Zaměřili jsme se na 4 polymorfizmy a to rs17878362:A1>A2, rs1042522:G>C, rs12947788:C>T a rs17884306:G>A. Z výsledků vyplývá, že přítomnost variantní alely v kodonu 1042522 představuje zvýšené riziko vzniku karcinomu pankreatu (OR 1,73, 95% CI 1,26-2,39, p=0,001). Analýza haplotypů prokázala, že přítomnost haplotypu A2CCG byla ve srovnání s nejčastějším haplotypem A1GCG asociována se zvýšeným rizikem (OR 1,39, 95%CI 1,02-1,88, p=0,034), naopak přítomnost haplotypu A1CCG se sníženým rizikem (OR 0,30, 95%CI 0,12-0,76, p=0,011) vzniku karcinomu pankreatu.

6 DISKUZE

Dosud je známo velice málo o rizikových faktorech vzniku karcinomu pankreatu. Některé z těchto případů mohou být spojeny s hereditárními nádorovými syndromy jako hereditární pankreatitida nebo hereditární karcinom prsu (BRCA1, BRCA2) [23]. Pravděpodobně většina případů je sporadických a tudíž je velmi obtížné určit jasný predisponující faktor onemocnění.

Bylo by vysoce efektivní najít takový predisponující genetický faktor, který by vyčlenil skupinu zdravých lidí s vysokým rizikem a umožnil je zařadit do skrínigového programu s účelem časného zachytu onemocnění. Celosvětově existuje poměrně málo publikací o polymorfizmech metabolických genů a riziku vzniku karcinomu pankreatu. V České republice takové studie nebyly dosud publikovány. Hlavním problémem je shromáždění dostatečně velkého souboru pacientů, který by umožnil statistickou analýzu. Podobná situace platí pro studium vztahu genetických polymorfizmů k přežívání pacientů s karcinomem pankreatu.

Během své postgraduální práce jsem se také zaměřil na studium efektivity protinádorové terapie a genetických polymorfizmů. Vzhledem k často nízkému výkonnostnímu stavu pacientů v době diagnózy a množství terapeutických režimů, včetně klinických studií, nebylo možno vytvořit dostatečně velké skupiny pacientů pro statistickou analýzu. V této práci bychom rádi pokračovali, jelikož vzhledem k rychlé progresi onemocnění by bylo vhodné predikovat skupiny pacientů s potenciální odpovědí na jednotlivá chemoterapeutika a zvýšit tak jejich šanci na dlouhodobé přežívání. Dle klinických zkušeností se však zdá, že možnosti klasických chemoterapeutických režimů jsou v současnosti vyčerpány a léčba bude směřována spíše na cílenou léčbu. V současné době probíhá celosvětově řada klinických studií, které se zaměřily právě na možnosti cílené terapie. Jako nadějně se zdají inhibitory přenosu buněčného signálu ať již na úrovni buněčných receptorů nebo intracelulárního přenosu informace.

Naše studie je první studií zkoumající polymorfizmy v uvedených biotransformačních genech a celkové přežívání pacientů s karcinomem pankreatu.

Epidemiologická data

V naší studii se nepodařilo potvrdit obecně uznávaná epidemiologická data. Kouření jako rizikový faktor [24], stejně jako konzumace alkoholu, diabetes mellitus [25] a nadváha nepředstavovaly statisticky významný rizikový faktor.

CYP 1B1

Polymorfizmy v cytochromu P450 jsou dávány do souvislosti se zvýšeným rizikem řady nádorových onemocnění zahrnujících karcinom tlustého střeva [26], plic [27], prostaty [28], ledvin [29], hlavy a krku [30] a konečně i karcinom pankreatu [31].

V naší studii nebyl nalezen vztah mezi polymorfizmem v genu pro *CYP1B1* exonu 453 a rizikem vzniku karcinomu pankreatu. Podobně nebyla nalezena asociace mezi přežíváním pacientů s karcinomem pankreatu a oběma sledovanými polymorfizmy v *CYP1B1*. Studie vztahu polymorfizmu v *CYP1B1* k přežívání pacientů s karcinomem pankreatu nebyla dosud publikována.

V naší studii jsme však našli signifikantní vztah mezi polymorfizmem v kodonu 432 genu *CYP1B1* a rizikem vzniku karcinomu pankreatu. U histologicky verifikovaných pacientů, byla nalezena ještě silnější asociace. Nosiči divokého genotypu mají vyšší riziko pro vznik onemocnění. Tento výsledek je v literatuře o karcinomu pankreatu zcela unikátní. Byla publikována studie, ve které byla nalezena zvýšená hladina aduktů hemoglobinu, odvozených od 4-aminobiphenylu, u nosičů divokého genotypu. Zvýšená aktivita enzymu divokého typu tudíž může predisponovat k poškození biomakromolekul a představuje možný mechanismus účinku námi nalezeného vztahu polymorfizmu *CYP1B1* k riziku vzniku karcinomu pankreatu (vyšší aktivita enzymu aktivujícího prokarcinogeny = vyšší riziko vzniku nádoru).

GSTM1

I když *GSTM1-null* genotyp je předpokládaným rizikovým faktorem pro karcinom plic [32] dle našich zjištění není zřejmá souvislost s rizikem karcinomu pankreatu. Naše výsledky se shodují s dříve publikovanými pracemi [33], [34], [35].

GSTP1

Z našich výsledků vyplývá, že přítomnost variantní alely v kodonu 105 byla asociována se zvýšeným rizikem karcinomu pankreatu u pacientů mladších 50 let. Naše studie podporuje dříve publikované výsledky o roli *GSTP1* v patogenezi karcinomu slinivky břišní [33].

GSTT1

GSTT1-null genotyp byl asociován se zvýšeným rizikem karcinomu pankreatu (1,56-krát vyšší riziko). Tento výsledek byl evidentní u subjektů starších 50 let (1,66-krát vyšší riziko), u mladších bylo riziko nevýznamné. První studie tohoto typu nenalezla asociaci *GSTT1-null* genotypu s karcinomem pankreatu. Duell et al. však udávají, že kombinace kouření a delece v polymorfizmu *GSTT1* je spojená se zvýšeným rizikem karcinomu pankreatu a toto riziko je vyšší u žen [34], [35]. V naší studii nebylo riziko ovlivněno kouřením ani pohlavím. Kombinace polymorfizmů v *GSTT1* a *GSTP1* měla multiplikační efekt a zvyšovala riziko vzniku karcinomu pankreatu 2,5-krát.

EPHX

EPHX je jeden z mnoha enzymů, které se účastní metabolismu endogenních a exogenních látek. Některé studie našly vztah polymorfizmů v *EPHX* s rizikem karcinomu ovaria [36] a rizikem nádorů plic [37]. Nicméně většina dosavadních studií proběhla na poměrně malém souboru pacientů a kontrol a je tedy nutné je dále ověřit.

V naší studii jsme nenašli jednoznačný vztah polymorfizmu v genu *EPHX* k riziku vzniku a přežíváním karcinomu pankreatu.

NQO1

Byla publikována řada prací dokazujících vztah polymorfizmů v *NQO1* s nádorovým onemocněním, např. s nádory plic [38], kolorektálním karcinomem [39], karcinomem močového měchýře [40]. V několika publikovaných studiích bylo prokázáno, že zvýšená aktivita enzymu je spojena se sníženým rizikem vzniku karcinomu pankreatu. Tento vztah platil ještě výrazněji u kuřáků, kde NQO1 působil jako ochranný faktor [41].

Ve většině publikovaných studií však velikost souboru pacientů byla poměrně malá a z toho vyplývá i malá síla studií. V našem souboru se nepodařilo jednoznačně prokázat vztah polymorfizmu *NQO1* s rizikem vzniku karcinomu pankreatu a s celkovým přežíváním.

Vzhledem k malému množství pacientů se shodnou onkologickou terapií nebylo možno zhodnotit vztah polymorfizmů k různým chemoterapeutickým režimům a k potenciální odpovědi na ně.

7 PUBLIKACE

Publikace, které jsou podkladem dizertační práce

1] VRANA D, NOVOTNY J, HOLCATOVA I, HLAVATA I, SOUČEK P. CYP1B1 gene polymorphism modifies pancreatic cancer risk but not survival, Neoplasma. 2010;57(1):15-9. IF 1,192

2] VRANA D, PIKHART H, MOHELNIKOVA-DUCHONOVA B, HOLCATOVA I, STRNAD R, SLAMOVA A, SCHEJBALOVA M, RYSKA M, SUSOVA S, SOUCEK P. The association between glutathione S-transferase gene polymorphisms and pancreatic cancer in a central European Slavonic population. Mutat Res-Gen Tox Environm Mutag 2009;680:78–81. IF: 2.556

3] MOHELNIKOVA-DUCHONOVA B, VRANA D, HOLCATOVA I, RYSKA M, SMERHOVSKY Z, SOUCEK P. CYP2A13, ADH1B, and ADH1C Gene Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk, Pancreas. 2010;39(2):144-148. IF: 2.733

4] HOLCATOVA I, SOUCEK P, VRANA D, SLAMOVA A, SCHEJBALOVA M., STRNAD R, BRABEC M, RYSKA M. Nádory slinivky břišní II, Praktický lékař. 2008, 88, č. 8 IF: 0

5] NACCARATI A, PARDINI B, POLAKOVA V, SMERHOVSKY Z, VODICKOVA L, SOUCEK P, VRANA D, HOLCATOVA I, RYSKA M, VODICKA P. Genotype and haplotype analysis of TP53 gene and the risk of pancreatic cancer: an association study in the Czech Republic., Carcinogenesis. 2010;31(4):666-70. IF: 4,795

Publikace beze vztahu k tématu dizertace:

1] VACLAVIKOVA R, KUBALA E, KODET R, MRHALOVA M, NOVOTNY J, VRANA D, GUT I, SSOUCEK P. Úloha exprese genů chinonoxireduktázy 1 a 2 v rozvoji karcinomu prsu. Klinická onkologie, 20, 5/2007 IF: 0

8 LITERATURA

- [1] Cancer Incidence 2005 in the Czech Republic, IHIS CR, NOR CR, Czech Republic 2008, p62.
- [2] NOVOTNY, VITEK, PETRUZELKA, Klinická a radiační onkologie pro praxi, Triton, 2005.
- [3] KLENER P, Klinická onkologie, Galen, 2002.
- [4] Mezinárodní klasifikace nádorových onemocnění 10, 2008.
- [5] Zásady cytostatické léčby maligních onkologických onemocnění, 11.vydání, Brno, 2010.
- [6] <http://flipper.diff.org/app/pathways/info/2254>
- [7] DI GIUSEPPE, HRUBAN JA, OFFERHAUS RH et al. K- ras mutation in mucinous pancreatic ductal hyperplasia from a patient with a family history of pancreatic carcinoma. Am. J. Pathol., 144, 889-895, 1994.
- [8] ROBBERT JC., SLEBOS JA, HOPPIN PE, TOLBERT EA et al. K-ras and p53 in Pancreatic Cancer: Association with Medical History, Histopathology, and Environmental Exposures in a Population-based Study Cancer Epidemiol Biomarkers Prev November 2000 9:1223-1232.
- [9] ALMOGUERA C, SHIBATA D., FORRESTER K., MARTIN J al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutantc-K-ras genes. Cell, 53: 549–554, 1988.
- [10] HRUBAN RH, VAN MANSFELD, AD, OFFERHAUS GJ, VAN WEERING D H et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas.Am. J. Pathol., 143: 545–554, 1993.
- [11] CALDAS C, HAHN SA, DA COSTA LT, et al., Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinomaNature Genetics 8, 27 - 32 (1994).
- [12]FORETOVA L, PETRAKOVA K. Dispenzarizace dedicnych nádorových syndromu. Klinicka onkologie, 2009,22.

- [13] PFUTZER R, MYERS E, APPLEBAUM-SHAPO S, FINCH R, et al. Novel cationic trypsinogen (PRSS1) N29T and R122C mutations cause autosomal dominant hereditary pancreatitis, *Gut* 2002;50:271-272.
- [14] KOUDOVA M, KOTALOVA R, SPICAK J, MACEK M. Jr, Hereditární pankreatitida *Klin Onkol* 2009; 22(Suppl): S54–S55.
- [15] SU GH, HRUBAN RH, BANSALRK, et al. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Amu. J. Pathol.*, 154: 1835-1840, 1999.
- [16] SEIDEGARD J, DePIERRE JW. Microsomal epoxide hydrolase. Properties, regulation and function. *Biochim Biophys Acta* 1983;695:251–70.
- [17] HASSETT C, AICHLER L, SIDHU JS, OMIECINSKI CJ. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet* 1994;3:421–8.
- [18] HARRISON DJ, HUBBARD AL, MACMILLAN J, WYLLIE AH, SMITH CA. Microsomal epoxide hydrolase gene polymorphism and susceptibility to colon cancer. *Br J Cancer* 1999;79:168–71 .
- [19] STRANGE RC., SPITERI MA., RAMACHANDRAN S., FRYER AA., Glutathione-S-transferase family of enzymes *Mutat. Res.* 482(1-2), 21-26 (2001).
- [20] MITROU P, WATSON M, BINGHAM S, STEBINGS WS, SPEAKMAN CT, LOKTIONOV A. NQO1 and mEH exon 4 (mEH4) gene polymorphisms, smoking and colorectal cancer risk. *IARC Sci Publ* 2002;156:495–7.
- [21] MARSÁKOVÁ, L., ÚLOHA POLYMORFISMŮ VYBRANÝCH BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ V GENOTOXICITĚ A KARCINOGENEZI, PRAHA, 2008.
- [22] [HTTP://WWW.THELABRAT.COM/RESTRICTION/INDEX.SHTML](http://www.thelabrat.com/restriction/index.shtml)
- [23] KLEIBL, NOVOTNY, Hereditarni nadorove syndromy, TRITON, 2003.

- [24] BERRINGTON DG, A., SPENCERE A., BUENO DE MESQUITA HB., et al, Anthropometry , physical activity and the risk of pancreatic cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2006, 15, 879-885.
- [25] SVACINA, S., MATOULEK, M., SVOBODOVA, S., et al., Nadory traviciho traktu a diabetes mellitus, *Vnitri lekarstvi*, 2004, 386-391.
- [26] BETHKE L, WEBB E, SELICK G, et al. Polymorphisms in the cytochrome P450 genes CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 and colorectal cancer risk. *BMC Cancer* 2007;7:123.
- [27] WU MF, WU WJ, CHANG GC, et al. Increased expression of cytochrome P4501B1 in peripheral leukocytes from lung cancer patients. *Toxicol Lett* 2004;150:211–9.
- [28] CHANG BL, ZHENG SL, ISAACS SD, et al. Polymorphisms in the CYP1B1 gene are associated with increased risk of prostate cancer. *Br J Cancer* 2003;89:1524–29.
- [29] SASAKI M, MASAHIRO Y, OKINO, ST, et al. Polymorphisms of the CYP1B1 Gene as Risk Factors for Human Renal Cell Cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2015-19.
- [30] KO Y, ABEL J, HARTH W, et al. Association of CYP1B1 Codon 432 Mutant Allele in Head and Neck Squamous Cell Cancer Is Reflected by Somatic Mutations of p53 in Tumor Tissue. *Cancer Res* 2001;61:4398-4404.
- [31] CROUS-BOU M, DE VIVO I, PORTA M, et al. CYP1B1 Polymorphisms and K - ras Mutations in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2008;53:1417-21.
- [32] CARLSTEN C, SAGOO GS, FRODSHAM AJ, et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and lung cancer: a literature-based systematic HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008;167:759-74.
- [33] JIAO L, BONDY ML, HASSAN MM, et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms and risk and survival of pancreatic cancer. *Cancer* 2007;109:840-8.

- [34] DUELL EJ, HOLLY EA, BRACCI PM, et al. A population-based study of the Arg399Gln polymorphism in X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2002;62:4630-6.
- [35] LIU G, GHADIRIAN P, VESPRINI D, et al. Polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2000;82:1646.
- [36] ALNCASTER JM, BROWNLEEHA., BELL DA et al' Microsomal epoxide hydrolase polymorphism as a risk factor for ovarian cancer, *Molecular Carcinogenesis*, Volume 17 Issue 3, Pages 160 – 162, Published Online: 7 Dec 1998.
- [37] BENHAMOU S, REINIKAINEN M, BOUCHARDY CH, DAYER P, HIRVONEN A, Association between Lung Cancer and Microsomal Epoxide Hydrolase Genotypes, *CANCER RESEARCH* 58. 5291-5293, December 1, 1998.
- [38] PINPIN L, YU-MEI H, JIUNN-LIANG K et al., Analysis of NQO1, GSTP1, and MnSOD genetic polymorphisms on lung cancer risk in Taiwan, *Lung cancer*, Volume 40, Issue 2, 2003, 123_129.
- [39] LIFANG HOU, NILANJAN CH., WEN-YI H et al., CYP 1A1 Val and NQO1 Ser polymorphisms, cigarette use, and risk for colorectal adenoma, *Carcinogenesis*, 2005.
- [40] PARK SJ, ZHAO H, SPITZ MR, GROSSMAN HB, WU X, Mutat , An association between NQO1 genetic polymorphism and a risk of bladder cancer. *Res*, 2003 Apr 20, 536 (1-2). 131-137.
- [41] COOK BD, YAN-SANDERS Y, MOORE S et al., Increased levels of NADPH: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in pancreatic tissues from smokers and pancreatic adenocarcinomas: A potential biomarker of early damage in the pancreas, *Cell Biology and Toxicology*, Volume 22, Number 2, 2006, 73-80.

9.1 Dotazník pro subjekty hodnocení

STUDIE ONEMOCNĚNÍ PANKREATU
Dotazník životního stylu

Datum rozhovoru:

Část A:

INFORMACE O PACIENTOVI

1. Identifikační číslo: PC |__|__| |__||__||__||__|
2. Pohlaví: (1) Muž (2) Žena
3. Datum narození: |__|__| |__|__| |__|__| (dd mm rr)
4. Stav: (1) Svobodný/á (2) Ženatý / Vdaná / Žijící ve společné domácnosti (3) Vdova/ec (4) Rozvedený/á (5) Jiný
5. Nejvyšší dosažené vzdělání: (1) Základní dokončené před 15 rokem (2) Vyučen (3) Středoškolské s maturitou (4) Nižší VŠ (bakalářské), ev. nástavby atd.? (5) Vysokoškolské
6. Obec, kde žijete:
7. Jak jste vysoký/á? |__||__||__| cm
Jak vysoký/á jste byl/a ve 20 letech? |__||__||__| cm
Jak vysoký/á jste byl/a před 2 lety? |__||__||__| cm
8. Kolik vážíte? |__||__||__| kg
Kolik jste vážil/a ve 20 letech? |__||__||__| kg
Kolik jste vážil/a ve 40 letech? |__||__||__| kg

Část B: OSOBNÍ ANAMNÉZA

9. Trápila Vás některá z následujících chorob?

Onemocnění	a. Ano/ Ne	b. Věk při prvních příznacích	c. Byl/a jste na operaci? Ano/ Ne	d. Předepsal vám lékař nějaké léky? Ano/ Ne	e. Jaké léky?	f. Kolik let jste léky užíval/a?
Diabetes		_ _				
Žlučové kameny		_ _				
Pankreatitis		_ _				
Peptický vřed		_ _				
Astma		_ _				
Alergie		_ _				
Zánět žil		_ _				
Nádorové on.		_ _				

10. Bral/a jste pravidelně, tj. alespoň 1x týdně po 1 rok aspirin n. jiné protizánětlivé léky?
(1)Ano (2)Ne

Pokud ano,

Od (věk)	Do (věk)	Důvod pro aspirin/ jiné protizánětlivé léky
_ _	_ _	
_ _	_ _	

Část C: RODINNÁ ANAMNÉZA

11. Kolik bratrů, sester, synů, dcer máte (neuvádějte nevlastní sourozence):

Bratři Sestry Synové Dcery

12. Trpěl někdo z Vašich blízkých někdy zánětem nebo nádorem slinivky:
(1) Ano (2) Ne

↓
Pokud ano,

a. Příbuzný (Kód 1-6)	b. Věk v době diagnózy	c. Které onemocnění bylo diagnostikováno? Pankreatitis Nádor pankreatu	e. Žije nebo zemřel/a ?	f. Zemřel/a na tuto nemoc nebo na něco jiného?

a. Příbuzný (Kód 1-6)	b. Věk v době diagnózy	c. Které onemocnění bylo diagnostikováno? Pankreatitis Nádor pankreatu	e. Žije nebo zemřel/a ?	f. Zemřel/a na tuto nemoc nebo na něco jiného?

13. Měl někdo z Vašich příbuzných “rakovinu”?

(1) Ano

(2) Ne

↓
Pokud ano,

a. Příbuzný	b. Věk v době diagnózy	c. Jaká rakovina (lokalizace)	d. Klasifikace nádoru (ICD-10)	e. Žije nebo zemřel/a ?	f. Zemřel/a na tuto nemoc nebo na něco jiného ?

Část D. KOUŘENÍ

- 14a. Vykouřil/a jste v průběhu života alespoň 100 cigaret/doutníků/dýmek? |Ano
|Ne
- 14b. Kouřil/a jste někdy cigarety/doutníky/dýmku pravidelně, tj. aspoň 1 cigaretu/doutník/dýmku za den po 1 rok? |Ano
|Ne
15. Kolik Vám bylo let, když jste začal/a poprvé pravidelně kouřit? || let
16. Kouříte dosud? |Ano
|Ne
17. Kolik Vám bylo let, když jste přestal/a **pravidelně** kouřit? || let

Část E. ALKOHOLICKÉ NÁPOJE, KÁVA A ČAJ, KONZUMACE MASA A ZELENINY/OVOCE

18. Konzumoval/a jste někdy pravidelně, tj. aspoň jednou týdně po 1 rok alkoholické nápoje? |Ano
|Ne
19. Kolik Vám bylo let, když jste ji začal/a konzumovat alkohol pravidelně? || let
20. Konzumujete dosud alkoholické nápoje pravidelně? Jak často? |Ano |Ne
Denně |
3 – 5x týdně |
Méně než 1x týdně |

21. Kolik Vám bylo let, když jste přestal/a konzumovat alkohol pravidelně?

let

22. V průběhu typického týdne, kolik asi sklenic jste vypil/a? Skončete buď současností nebo věkem, kdy jste přestal/a pít alkohol. Započítejte i přestávky, kdy jste přestal/a pít na dobu delší než 1 rok.

	Od věku	Do věku	Pivo (0,5 l /týden)	Víno (0,2 l /týden)	Aperitiv/ desertní vína (0,1 l /týden)	Doma vyráběné destiláty (skleničky / týden)	Komerční destiláty (skleničky / týden)
i.	<input type="text"/>	<input type="text"/>					
ii.	<input type="text"/>	<input type="text"/>					
iii.	<input type="text"/>	<input type="text"/>					
iv.	<input type="text"/>	<input type="text"/>					

23. Vzpomeňte si, jak často jste pil/a čaj a kávu?

Frekvence	Káva	Čaj (černý)
Nikdy, méně než jednou měsíčně		
Méně než jednou týdně		
1-2 x týdně		
4-5 x týdně		
1-2 x denně		
3-4 x denně		
Více než 4x denně		

24. Jakou kávu většinou pijete?

"turka"

bez lógru (překapávanou, rozpustnou, preso,...)

25. Konzumujete pravidelně maso, zeleninu/ovoce?

Frekvence	Maso	Zelenina/ovoce
Nikdy, méně než jednou měsíčně		

Méně než jednou týdně		
1-2 x týdně		
4-5 x týdně		
denně		

Část F. FYZICKÁ AKTIVITA

I. Fyzická aktivita v zaměstnání

26. V jakém zaměstnání jste pracoval převážnou část svého života?

27. Byla vaše práce fyzicky namáhavá?

II. Fyzická aktivita ve volném čase

28a. Chodil/a jste někdy cvičit/sportovat ve svém volném čase, t.j. alespoň **30 minut každý týden v roce** nebo **2 hodiny/týden po 3 měsíce** ? Ano Ne

28b. Vzpomeňte si na situaci před rokem, chodil/a jste někdy cvičit/sportovat ve svém volném čase, t.j. alespoň **30 minut každý týden v roce**, nebo **2 hodiny/týden po 3 měsíce**? Ano Ne

28c. Pokud Ne, kdy jste skončil/s s pravidelným sportováním/cvičením?

Věk.....

Část G. GYNEKOLOGICKÁ ANAMNÉZA (Pouze pro ženy)

29. Byla jste někdy těhotná? Ano
Kolikrát? Ne

30. Měla jste někdy potrat? Ano
Kolikrát? Ne

31. Od kolika let máte menstruaci? Nikdy nemenstruovala
 9 nebo mladší
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17 nebo starší
 nevím

I. Perorální kontraceptiva

32. Užívala jste někdy perorální antikoncepci dva a více měsíců? Ano
 Ne
33. Kolik vám bylo let, když jste začala užívat antikoncepci? (věk)
34. Kolik měsíců nebo let jste užívala orální antikoncepci? (měsíce)
nebo
 (roky)
35. Užíváte ještě orální antikoncepci? Yes
 Ne
36. V kolika letech jste přestala brát orální antikoncepci? (věk)

II. Užívání Hormonální Substituční Terapie (HRT)

- 37a. Užívala jste někdy nějaký ženský hormon dva nebo více měsíců, např. estrogeny kvůli návalům nebo jiným problémům menopausy? Ano
 Ne
- 37b. Kolik vám bylo let, když jste tuto léčbu začala užívat? (Věk)
- 37c. Kolik měsíců nebo let jste celkem užívala HRT? (měsíce)
nebo
 (roky)
- 37d. Užíváte ještě HRT? Ano
 Ne

37e. V kolika letech jste přestala brát HRT?

|_|_| (věk)

7. Hyden, D., Roberg, M., Forsberg, P. et al. Acute "idiopathic" peripheral facial palsy: clinical, serological, and cerebrospinal fluid findings and effects of corticosteroids. *Am. J. Otolaryngol.* 1993, 14, p. 179-186.

8. Jäämaa, S., Salonen, M., Seppälä, I. et al. Varicella zoster and *Borrelia burgdorferi* are the main agents associated with facial paresis, especially in children. *J. Clin. Virol.* 2003, 27, p. 146-151.

9. Kohler, A., Chofflon, M., Sztajzel, R., Magistris, M.R. Cerebrospinal fluid in acute peripheral facial palsy. *J. Neurol.* 1999, 246, p. 165-169.

10. Ljostad, U., Okstad, S., Topstad, T. et al. Acute peripheral facial palsy in adults. *J. Neurol.* 2005, 252, p. 672-676.

11. Mauch, E., Vogel, P., Kornhuber, H.H., Hahnel, A. Clinical value of antibody titers to *Borrelia burgdorferi* and titer course in neurologic disease pictures. *Nervenarzt.* 1990, 61, p. 98-104.

12. Pachner, A.R., Steere, A.C. The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis. *Neurology* 1985, 35, p. 47-53.

13. Roberg, M., Ernerudh, J., Forsberg, P. et al. Acute peripheral facial palsy: CSF findings and etiology. *Acta Neurol. Scand.* 1991, 83, p. 55-60.

14. Sobek, O., Adam, P., Zeman, D. a kol. Likvorové parametry u pacientů s neuroboreliózou. *Klin. Biochem. Metab.* 1998, 6, s. 229-234.

15. Vlčková, E., Švecová, E., Bourač, P. a kol. PCR diagnostika herpetických virů u pacientů s akutní „idiopatickou“ parézou lícního nervu. *Cesk. Slov. Neurol. N.* 2008, 71/104: s. 201-205.

MUDr. Eva Vlčková
Neurologická klinika FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
E-mail: evlckova@email.cz

Nádory slinivky břišní II.

HOLCÁTOVÁ I.¹, SOUČEK P.², VRÁNA D.³, SLÁMOVÁ A.¹, SCHEJBALOVÁ M.¹, STRNAD R.³, BRABEC M.², RYSKA M.⁴

¹Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav hygieny a epidemiologie, Praha

Přednosta: prof. MUDr. Vladimír Bencko, DrSc.

²Odborná skupina biotransformací, Státní zdravotní ústav, Praha

Ředitel: MUDr. Milan Bořek.

³Onkologické centrum Baťovy nemocnice Zlín

Primář: MUDr. Milan Kohoutek.

⁴Chirurgická klinika 2. lékařské fakulty

a Ústřední vojenské nemocnice Praha

Přednosta: prof. MUDr. Miroslav Ryska, CSc.

SOUHRN

Karcinom slinivky břišní patří k nádorům s nejhorší prognózou. Dosud se nepodařilo spolehlivě odhalit rizikové faktory. Vzhledem k tomu, že Česká republika patří ke státům s nejvyšším výskytem tohoto onemocnění na světě, iniciovala Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny studii případů a kontrol nádorů slinivky břišní. Tato studie má odhalit rizikové faktory specifické pro středoevropský region, Českou republiku zvláště.

Výsledky epidemiologické části studie nepodalý vysvětlení relativně vysokého výskytu tohoto nádoru ve střední Evropě. První genetické analýzy přinášejí zajímavé výsledky, které je však třeba potvrdit na větších souborech.

Klíčová slova: karcinom slinivky břišní, rizikové faktory, genetické analýzy.

SUMMARY

Holcátová I., Souček P., Slámová A., Schejbalová M., Brabec M., Ryska M.: Pancreatic cancer II.

Pancreatic carcinoma is one of the tumours with the worst prognosis. Even today its risk factors are not clear. Since the Czech Republic is one of the countries with the highest occurrence of this disorder in the world, a case-control study of this tumour was initiated by the International Agency for Research on Cancer, originally only in Czech Republic, with possible enlargement to other centres. The epidemiological part of the study gave no valid explanation for the relatively high occurrence of pancreatic tumours in Central Europe. First genetic analyses have produced interesting results, but a larger set of samples is necessary to confirm them.

Key words: pancreas, carcinoma, risk factors, genetic analysis

Prakt. Lék. 2008, 88, No. 8, pp. 462-465.

Úvod

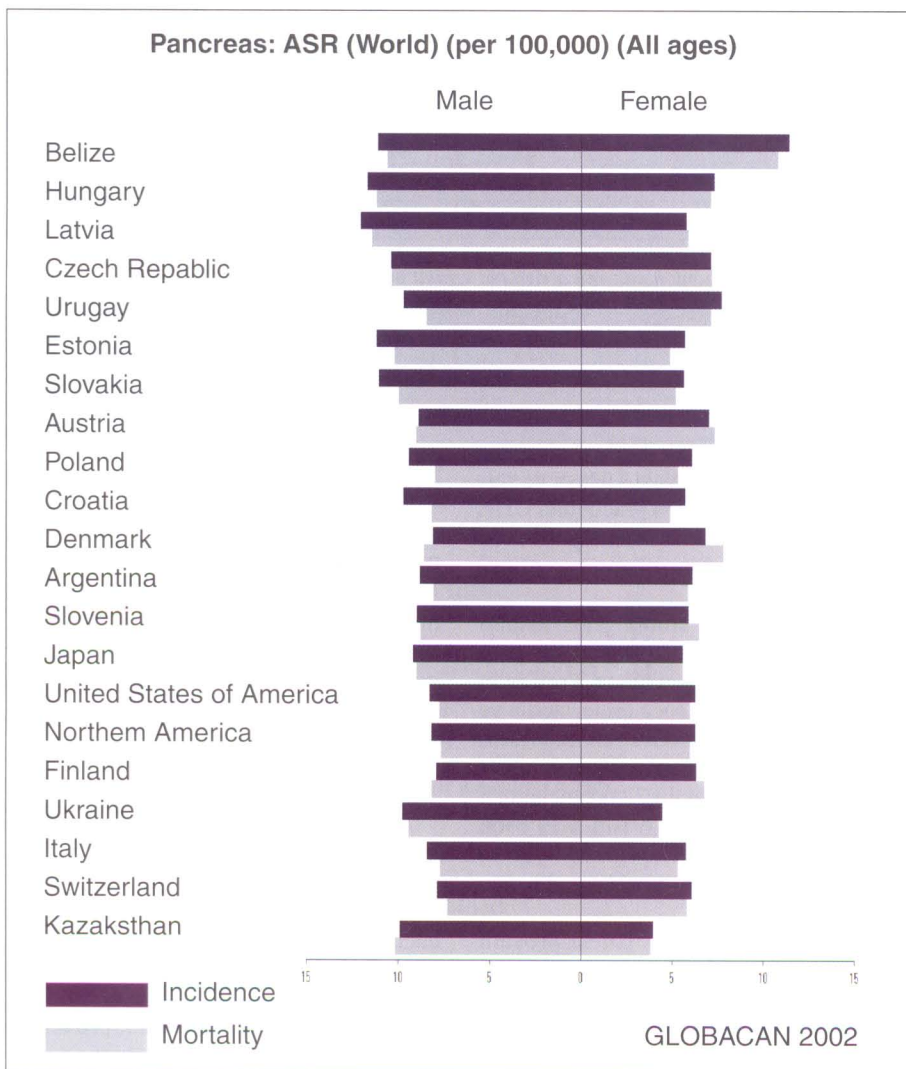
Česká republika se řadí mezi státy s nejvyšším výskytem nádorových onemocnění na světě. V některých případech patříme do skupiny s absolutně nejvyšším výskytem (4). K těmto nádorům se řadí i nádory slinivky břišní (graf 1, obrázek 2, 3).

Vzhledem k této relativně vysoké četnosti a také vzhledem k tomu, že socioekonomický dopad rakoviny pankreatu je značný zejména díky pozdnímu zachytu a vysoké mortalitě, iniciovala Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) studii případů a kontrol nádorů slinivky břišní v České republice s cílem nalézt

alespoň potenciální rizikové faktory, které by alespoň částečně objasnily vysoký výskyt těchto nádorů u nás a ve středoevropském regionu.

Udává se, že až 98 % všech nádorů slinivky břišní vychází z z exokrinní části pankreatu, dvě třetiny z nich jsou lokalizovány v hlavě pankreatu (3). Tato lokalizace může vést k relativně časnějšímu zachytu vzhledem k možné blokádě Vaterské papily, může dojít k záměně za tumor Vaterské papily, duodena nebo žlučovéhoodu. Diagnózu lze stanovit zobrazovacími metodami (CT, ERCP), stanovení stagingu se provádí endoultrasonografií (EUS) s aspirační biopsií (FNAB) (8).

**Pro ordinaci
praktického lékaře
pro dospělé ve Vrchlabí
přijmu lékaře/lékařku.
Nástup dle dohody.
MUDr. Jana Schmidtová.
E-mail:
janapaseka.schmidt@
seznam.cz.**



Graf 1. Odhad výskytu karcinomu slinivky břišní ve světě (zdroj: GLOBOCAN 2002, IARC)

V letech 2004–2006 jsme řešili grantový projekt Studie případů a kontrol nádorů pankreatu podpořený prostředky z Interní

grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR (IGA 8090-3). Od roku 2007 řešíme grantový projekt Vliv faktorů život-

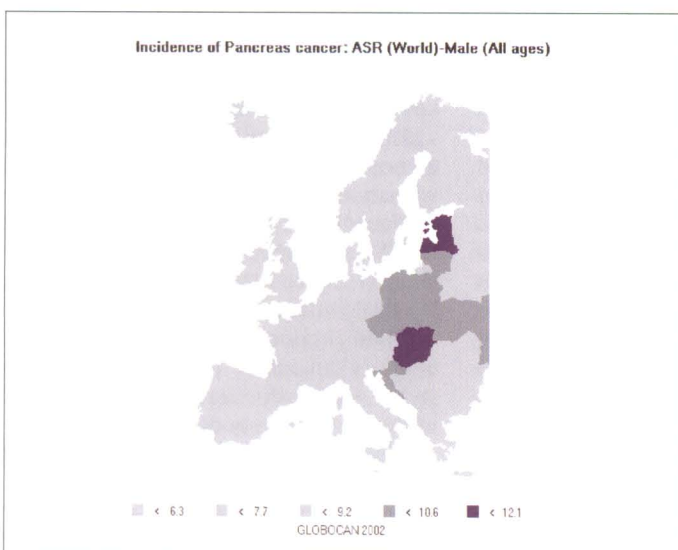
ního prostředí a genetické determinanty nádorů pankreatu (genetický profil) IGA 9422-3.

Opět se jedná o studii případů a kontrol, i metodika sběru dat a biologického materiálu je shodná se studií předchozí. Nová studie zdvojnásobí soubor pacientů a kontrol. Vzhledem k zapojení chirurgického pracoviště, které se specializuje na tuto problematiku, je diagnostika v době záchytu přesnější a máme možnost získat i část tkáně z tumoru. Pokračování projektu navýší velikost souborů a soustředí se na genetické analýzy biologického materiálu, především krevních vzorků, následně i tkáně z tumoru.

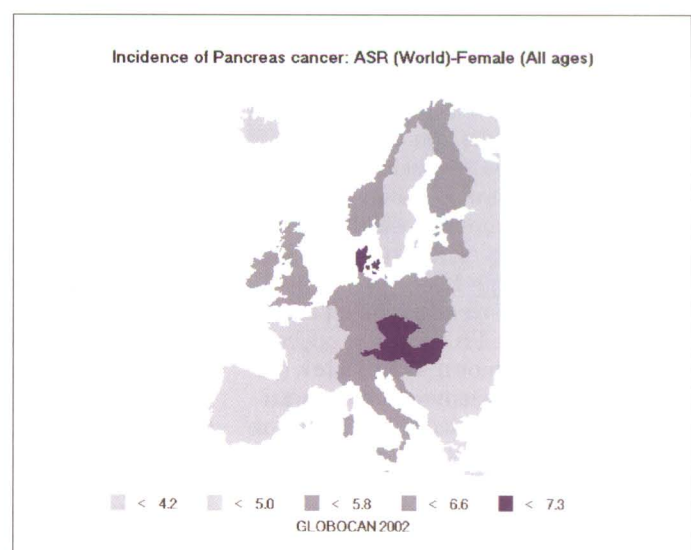
V roce 2006 jsme publikovali v Praktickém lékaři (5) metodickou část této studie. Článek byl zaměřen na způsob sběru dat a na analýzu faktorů životního stylu a některé choroby ve vztahu k nádorům slinivky břišní. Výsledky naší studie nepotvrdily ani v literatuře uváděné rizikové faktory, což mohlo být způsobeno malým rozsahem souboru.

Metodika

Kontakt na nemocné s nádory slinivky břišní získáváme ze spolupracujícího pracoviště Chirurgické kliniky 2. LF UK a ÚVN Praha, jejíž tým se na léčbu tohoto onemocnění dlouhodobě specializuje. Resekční výkon je jedinou současnou léčebnou metodou, která má potenciálně léčebné výsledky a významně prodlužuje život nemocných (1). Třileté přežívání po provedené resekci dosahuje 22 %, nejlepších výsledků je pochopitelně dosaženo ve stadiu I. Většina pacientů však spadala dle klasifikace nádorů do stádia III a vyšších (6). Případnou adjuvantní chemoterapii zajišťuje spolupracující onkologické pracoviště.



Obr. 2. Odhad výskytu karcinomu slinivky břišní v Evropě, muži (zdroj: GLOBOCAN 2002, IARC).



Obr. 2. Odhad výskytu karcinomu slinivky břišní v Evropě, ženy (zdroj: GLOBOCAN 2002, IARC).

Tab. 1. Významné vztahy mezi genetickými polymorfismy biotransformačních enzymů a rizikem vzniku nádorů pankreatu – *EPHX1*.

Genotyp	Kontroly	Případy	OR	95 % CI	P (2-sided)
<i>EPHX1-Tyr113Tyr</i>	48	15	-	-	-
<i>EPHX1-Tyr113His</i>	46	98	6,82	3,46 – 13,42	<0,001
<i>EPHX1-His113His</i>	20	22	3,52	1,52 – 8,14	0,003
<i>EPHX1-Tyr113His+His113His</i>	66	120	5,82	3,03 – 11,18	<0,001
Celkem	114	135			

Tab. 2. Významné vztahy mezi genetickými polymorfismy biotransformačních enzymů a rizikem vzniku nádorů pankreatu – *GSTM1*.

Genotyp	Kontroly	Případy	OR	95 % CI	P (2-sided)
<i>GSTM1-plus</i>	36	88	-	-	-
<i>GSTM1-null</i>	65	85	0,53	0,32 – 0,89	0,015
Celkem	101	173			

U nemocných indikovaných k operačnímu řešení karcinomu bylo vyžadováno předoperační provedení ERCP, kontrastního CT vyšetření a EUS s FNAB. K radiálnímu výkonu byli indikováni nemocní ve stadiu I, II a zčásti III, k paliativnímu resekcímu výkonu pacienti ve stadiu III a IVa bez předoperačně zjištěné angioin vazy (6).

Všichni nemocní, kteří byli indikováni k operačnímu výkonu na Chirurgické klinice 2. LF UK a ÚVN včetně paliativních výkonů, byli zařazeni do studie. Vzhledem k tomu, že primární indikace k výkonům neprobíhá na chirurgické klinice, je možné, že část pacientů, jejichž zdravotní stav či zjevná neresekabilita nepředpokládá možnost operačního výkonu, není odeslána na kliniku, a tedy nemůže být zařazena do studie. Další otázkou je, kolik pacientů s nádorem slinivky břišní nebylo diagnostikováno vzhledem k nemožnosti provedení některých vyšetření pro závažný zdravotní stav nemocných.

Pokud pacienti souhlasí s účastí ve studii, podepíší informovaný souhlas, který obsahuje informace o studii, o jejích cílech, o možných rizicích a benefitech. Obsahuje rovněž souhlas s jednotlivými částmi studie a informaci o tom, že mohou kdykoliv ze studie odstoupit nebo absolvovat pouze její část. Je-li to možné, ještě před operací vyplní pracovníci ÚHE s pacienty formou řízeného pohovoru dotazník, který zahrnuje otázky na rodinnou a osobní anamnézu včetně stručné pracovní anamnézy a relativně rozsáhlá část je věnována stravě.

V rámci odběrů na oddělení je pacientům odebrána krev. Při operaci je odebrán vzorek tkáně z tumoru. Tkáň i krev (po zpracování) jsou uloženy v hlubokomrazícím boxu (-79 °C), následně je transportována do příslušné laboratoře k analýzám. Informace z dotazníků jsou vkládány do databáze pod kódovými čísly, anonymně.

Kontrolní skupinu tvoří pacienti, které náhodně zastihneme u praktických lékařů. Pokud lidé, kteří přicházejí buď na odběry, nebo na preventivní prohlídky ke svému

praktickému lékaři souhlasí s účastí ve studii, je jim odebrána krev a pracovníci ÚHE s nimi vyplní formou řízeného pohovoru dotazník shodný s dotazníkem pro případy.

V průběhu první studie jsme získali informace a biologické vzorky od 150 párů případů a kontrol. Zpracovaná krev byla analyzována v prvním roce druhé studie ve společnických genetických laboratořích. V průběhu prvního roku řešení nového projektu jsme zachytili 72 potenciálních případů nádorů slinivky břišní a 39 osob kontrolních. Z těchto 72 případů bylo 40 mužů a 32 žen, 16 mužů a 23 žen v kontrolním souboru.

Izolace DNA z lymfocytů se provádí pomocí magnetické separace na přístroji KingFisher. Úsek genomové DNA obsahující sledovaný polymorfismus (variace v DNA přítomná u více než 1 % populace) je namnožen PCR (polymerázovou řetězovou reakcí) a naštěpen restrikčním enzymem, který rozezná divokou a variantní alelu. Výsledek je odečten pomocí agarozové elektroforézy, která umožňuje rozřídění vzorků na divoké (w/w), variantní (v/v) a heterozygotní (w/v) nosiče. Tato metoda restrikční analýzy je považována za klasickou.

Dále používáme novější metody jako je DNA sekvenování a nejnovější metodou, kterou používáme, je „real time PCR“, která pomocí fluorescenčně značených sond umožňuje rychlé a spolehlivé hodnocení jednotlivých genotypů.

Vzorky byly podrobeny studiu genetických polymorfismů biotransformačních enzymů:

- ◆ cytochromu P450 *CYP1B1* (kodon 432, aminokyselinová záměna Leu-Val a 453, Asn-Ser),
- ◆ epoxid hydroláza *EPHX1* (113, Tyr-His a 139, His-Arg),
- ◆ NADP(H)-chinon oxidoreduktáza *NQO1* (187, Pro-Ser),
- ◆ glutathion S-transferáza *GSTP1* (105, Ile-Val),
- ◆ *GSTM1* (null-delece celého genu), a
- ◆ *GSTT1* (null-delece celého genu) meto-

dami, které byly již zavedeny v rámci předchozích studií a jsou zmíněny výše.

Výsledky byly hodnoceny pomocí Pearsonova chí kvadrát testu a riziko bylo vyjádřeno pomocí Mantel-Hanszelova modelu odhadu relativního rizika (OR) a konfidenčních intervalů na hladině významnosti 95 % (95 % CI). K analýzám byl použit program SPSS v.14.

Výsledky

Celkem bylo předáno do konce roku 2007 do laboratoře 408 vzorků krve kontrolních osob a pacientů s nádorem pankreatu k izolaci DNA. V této skupině se nachází 165 vzorků kontrolních subjektů, 193 případů nádorů pankreatu, 25 vzorků s pankreatitidou a 25 nejasných případů. Izolace DNA byla úspěšně provedena u 340 vzorků.

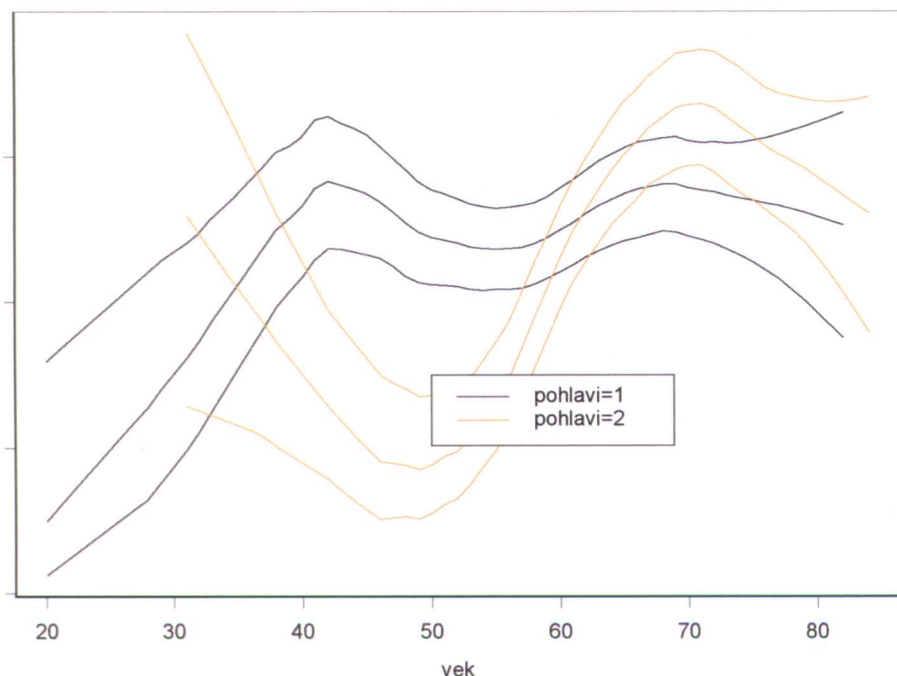
Z předběžného statistického hodnocení souboru vyplývá, že hrubý odhad relativního rizika (crude odds ratios) se neliší mezi skupinami kontrolních subjektů (n=165) a klinicky potvrzených případů (n=193) pro polymorfismy v genech *CYP1B1*, *NQO1*, *GSTP1* a *GSTT1*.

Pozoruhodný výsledek byl nalezen pro gen *EPHX1*, kde se polymorfismus v exonu 3 předběžně jeví jako silný rizikový faktor (OR = 5,82 znamená 5,82-krát vyšší riziko vzniku nádoru pankreatu u nosičů variantní alely na hladině významnosti $P < 0,001$) (**tab. 1**).

Naopak, nosičství variantní alely v genu *GSTM1* pravděpodobně působí jako protektivní faktor onemocnění (OR = 0,53, $P = 0,015$) (**tab. 2**).

První hodnocení epidemiologických údajů týkajících se především životního stylu nepřineslo statisticky významné výsledky, a to ani ty očekávané.

Věkové rozložení souboru případů a kontrol se neliší (5% hladina významnosti, Chí kvadrát = 6,497 d.f. = 4, $P = 0,165$). Věk (± 5 let) byl také jediným selekčním kritériem při výběru kontrolních osob. Věk je současně statisticky významným rizikovým faktorem [$P = 0,031$, log



Obr. 1. Odhad výskytu karcinomu slinivky břišní v Evropě, muži (zdroj: GLOBOCAN 2002, IARC)

$it(p_t) = -1,285 (0,598) + 0,021t (0,010)$], model naznačuje, že riziko onemocnění stoupá významně s věkem. (obr. 1).

V našem souboru je ovšem zřetelný mírný rozdíl ve výskytu nádoru z hlediska věku a pohlaví: u mužů vzestup začíná již ve věku středním (od cca 40 let), u žen vzestup zaznamenáváme až po 50. roce věku, respektive až kolem 60 let.

Vliv věku je tedy prokazatelný, vliv pohlaví je naproti tomu nevýznamný ($P = 0,554$), onemocnění se tedy vyskytuje stejnoměrně u mužů i u žen.

Diskuse

Kouření bývá uváděno jako sice slabý, ale jediný prokázaný rizikový faktor vzniku karcinomu pankreatu (2). V našem souboru se kouření nepodařilo na 5% hladině významnosti prokázat jako rizikový faktor ($P = 0,567$), stejně jako konzumaci alkoholu ($P = 0,276$), další potenciální rizikový faktor karcinomu slinivky břišní. Jako statisticky nevýznamný rizikový faktor se v naší studii ukázalo i předchozí onemocnění slinivky břišní, a to i v rodinné anamnéze ($P = 0,549$), narozdíl od operace žlučových kamenů. Výskyt této operace v předchorobí byl velmi významný ($P = 0,003$). Další studie by měly rozhodnout, zda se jedná o rizikový faktor, nebo marker, který ve značném předstihu upozorňuje na počínající onemocnění.

Onemocnění, jejichž význam se často diskutuje v souvislosti s karcinomem slinivky břišní, je diabetes 2. typu (7). Výskyt diabetu v anamnéze u pacientů s karcinomem slinivky břišní je statisticky významně vyšší ($p=0,007$), pravděpodobně se však incidence zvyšuje v důsledku změn probíhajících ve slinivce, kdy na základě procesů v tkáni diabetes vzniká. Diagnóza onemocnění diabetem je totiž většinou stanovena v posledním roce (6 měsících) před vlastní diagnózou nádoru.

Z ovlivnitelných rizikových faktorů, kromě kouření a konzumace alkoholu, které však v naší studii neměly dostatečnou statistickou významnost, by podstatnou úlohu mohla hrát obezita vzhledem k tomu, jak přibývá v naší populaci obézních lidí.

S postupujícím onemocněním pacienti ztrácejí na váze, a to statisticky velmi významně ($P < 0,0001$), podstatný však je stav před vznikem onemocnění. V průběhu řízeného rozhovoru se snažíme zjistit, zda došlo v průběhu života k významným výkyvům v hmotnosti, především zda podstatnou část života netrpěl pacient nadváhou. Když jsme však hodnotili body mas index (BMI) ve 20 letech, tedy dlouho před vznikem onemocnění, a 2 roky před stanovením diagnózy, ani jeden z těchto údajů nebyl statisticky významný ($P = 0,186$; $P = 0,982$). V obou případech se však jednalo o údaje anamnestické, nikoliv

antropometrické, a museli jsme spoléhat na paměť pacientů.

Závěr

V naší studii se dosud nepodařilo prokázat vliv ovlivnitelných rizikových faktorů. První výsledky genetické analýzy ukazují na možný vliv polymorfismů v genech biotransformace na vznik tohoto nádoru. Statistickým zhodnocením vzájemného možného ovlivnění genetických změn a rizikových faktorů by se mohl následně vysvětlit vysoký výskyt tohoto nádoru ve středoevropském regionu.

Nalezené výsledky bude třeba ověřit na větším souboru a zároveň posoudit možný vliv modifikujících faktorů (confounders) v oblasti životního stylu účastníků studie.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ 9422-3, etická komise VFN a I. LF UK vyslovila se studií souhlas.

Poděkování za technickou pomoc patří Lucii Kubátové, Ivě Otradovcové a DiZ. Šárce Adamčíkové.

Literatura

1. Beger, H.G., Rau B., Gansauge, F. et al. Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts. *World J. Surg.* 2003, 27, p. 1075-1084.
2. Berrington de González, A., Spencer, E.A., Bueno-de-Mesquita, H.B. et al. Anthropometry, physical activity, and the risk of pancreatic cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006, 15, 5, p. 879-885.
3. Ekblom, A., Hunter, D.: Pancreatic cancer. In: Adami, H.O., Hunter, D., Trichopoulos D.(eds.): Textbook of Cancer Epidemiology. *Oxford Press* 2002, p. 233-247.
4. Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., Parkin, D.M. GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase No. 5, version 2.0. Lyon: IARC Press, 2004.
5. Holcátová, I., Slámová, A. Nádory slinivky břišní I. Potenciální rizikové faktory. *Prakt. lék.* 2006, 86, 1, s. 4-7.
6. Ryska, M., Strnad, R., Bělina, F. a kol. Radikální resekce u nemocných s karcinomem hlavy pankreatu. Retrospektivní analýza přežívání u souboru 307 nemocných. *Rozhl. chir.* 2007, 86, 8, s. 432-439.
7. Svačina, Š., Matoulek, M., Svobodová, Š. a kol. Nádory trávicího traktu a diabetes mellitus. *Vnitř. lék.* 50, 2004, č. 5, s. 386-391.
8. Zavoral, M. a kol. Karcinom pankreatu. Galen 2005.

MUDr. Ivana Holcátová, CSc.

Svatovítská 5

160 00 Praha 6

E-mail: ivana.holcatova@lf1.cuni.cz

CYP1B1 gene polymorphism modifies pancreatic cancer risk but not survival

D. VRANA^{1,2,3}, J. NOVOTNY², I. HOLCATOVA⁴, I. HLAVATA^{3,5}, P. SOUCEK³

¹Department of medicine, Nemocnice Atlas, Zlin, Czech Republic, e-mail: davvrana@yahoo.com, ² Department of Oncology of the General Teaching Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic, ³Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic ⁴Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine, Institute of Hygiene and Epidemiology, Czech Republic, ⁵Charles University in Prague, 3rd Medical Faculty, Czech Republic

Received March 19, 2009

Pancreatic cancer represents one of the biggest problems of current oncology. The risk factors of pancreatic cancer development, as well as factors affecting survival are poorly understood. Since biotransformation enzymes modify detoxification of carcinogens, we supposed, that a relationship between their polymorphism and the risk of pancreatic cancer development and eventually its clinical outcome may exist.

Associations of so far not studied cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) polymorphisms with pancreatic cancer risk were investigated by case-control study. A total of 754 participants were recruited during study period. All patients were followed to determine their treatment and overall survival.

Carriers of rare genotype Val/Val in codon 432 of *CYP1B1* (rs1056836) were under significantly lower risk of pancreatic cancer than wild type carriers ($p=0.035$). Carriers of heterozygous genotype ($p=0.033$) and rare allele Val ($p=0.015$) were also under lower risk than wild type carriers. When histology-verified patients were analyzed separately, even more significant associations were found ($p=0.016$, $p=0.009$, $p=0.003$, respectively). On the contrary, *CYP1B1* polymorphism in codon 453 (rs1800440) did not significantly associate with pancreatic cancer risk. Median survival of patients with rare homozygous genotype Val/Val in *CYP1B1*-codon 432 was longer but not significantly different from those with wild-type homozygotes. The same was true for *CYP1B1*-codon 453 wild-type homozygotes in comparison with Ser/Ser rare homozygotes.

CYP1B1 polymorphism in codon 432 seems to modify the risk of pancreatic cancer development and should be further studied.

Keywords. Pancreatic cancer, CYP1B1, polymorphism, risk, survival

Pancreatic cancer represents one of the biggest challenges of current oncology due to its poor prognosis. The overall incidence of pancreatic cancer is growing rapidly. It has risen from 6.3 per 100,000 residents in 1980 to 9.6 per 100,000 in 2005 [1]. In the Czech Republic, pancreatic cancer is the eighth most prevalent cancer with almost 1200 new cases diagnosed annually. Despite a high mortality rate linked to pancreatic cancer, there is only little knowledge about its etiology. Therefore, it is important to understand how genetic factors contribute to clinical outcome of this disease.

Cytochrome P450 (CYP, EC 1.14.14.1) enzymes catalyzes a large number of reactions modifying dietary and smoking-derived pro-carcinogens including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), heterocyclic and aryl amines, and nitroaromatic hydrocarbons [2, 3]. When activated, these pro-carcinogens produce reactive intermediates that can cause

DNA damage and promote carcinogenesis. therefore this role, CYP1B1 (OMIM: 601771) is extensively investigated as a potential risk factor in human cancer [4]. Genetic polymorphism in *CYP1B1* was recently associated with increased risk and clinical outcome of wide variety of human cancers with suspected environmental component including colorectal [5], lung [6], prostate [7], renal cell [8], head and neck [9] and pancreatic [10] cancers.

CYP1B1 is located on chromosomal region 2p21–22 and consists of two introns and three exons of which two are translated into protein. A number of single nucleotide polymorphisms were described in *CYP1B1* [11]. We have focused on two most studied missense *CYP1B1* polymorphisms in codons 432 (rs1056836) and 453 (rs1800440) localized in exon 3 and their role in pancreatic cancer risk. These polymorphisms are associated with amino acid substitutions, Val432Leu and

Asn453Ser in the heme-binding domain of the enzyme. Therefore these mutations may interfere with heme incorporation, by affecting the hinge region and/or the conserved core structures (CCS) that determine the proper folding and heme-binding ability of P450 molecules [12]. Thereby these mutations of *CYP1B1* cause some alterations in substrate specificity and catalytic activity. Several studies indicate that these polymorphic variants of *CYP1B1* have greater hydroxylation activities and are considered to be candidates for cancer susceptibility [13, 14]. It has been reported that Leu allele carriers in the *CYP1B1* codon 432 are more active in oxidation of benzo[*a*]pyrene to benzo[*a*]pyrene-7,8-diol (in the presence of epoxide hydrolase) than the Val allele carriers which further lead to formation of carcinogen benzo[*a*]pyrene-7,8-diol-epoxide [15]. Since these polymorphisms may also influence the biotransformation of anticancer drugs, we investigated whether a relationship between polymorphisms and the clinical outcome (assessed by analysis of overall survival) exists.

Materials and methods

Study subjects. The association between pancreatic cancer risk and genetic polymorphisms was investigated in a case-control study. The enrollment of subjects to the study started in September 2004 and was closed in February 2008. A total of 754 participants were included into the study. Patients with pancreatic cancer were recruited at five oncology centers located in Prague, Pribram, Liberec, Rakovnik and Zlin. Patients were eligible for the study, when they fulfilled at least one of the following criteria:

- patient had histology- or cytology-confirmed pancreatic adenocarcinoma or
- patient had at least three of the following clinical signs of pancreatic cancer (weight loss, anorexia/cachexia, obstructive jaundice, mass on CT / MRI / endoscopic ultrasound scans, tumor markers elevation).

Controls were selected to have similar gender and age distribution as cases. We used two different control groups to increase the power of study. The first control group was composed of healthy volunteers recruited by general practitioners during regular preventive checkups. Second group was composed of blood donors. The first primary endpoint was the association between the risk of pancreatic cancer and *CYP1B1* polymorphisms, the second was the overall survival (OS), defined as the interval between the date of first histological verification of pancreatic cancer until death from any cause. Patients were followed through October 30, 2008. We performed a review of medical records to obtain information on chemotherapy and/or radiation for all eligible patients. Since the patient enrollment covered almost all regions of Czech Republic, we consider this study being adequately representative for Czech population. The design of the study was approved by the Ethical Committee of the 1st Medical Faculty, Charles University in Prague, Czech Republic.

Genotyping. Blood was collected during diagnostic procedures using tubes with K₃EDTA anticoagulant. DNA was isolated from lymphocytes using the phenol/chloroform extraction method [16]. Polymorphisms in *CYP1B1* were assayed using allelic discrimination with TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) by real time PCR in RotorGene 6000 (Corbett Research, Brisbane, Australia). The respected polymorphisms and assays were, *CYP1B1* codon 432 (Leu432Val, rs1056836 assay no.: C_3099976_30) and codon 453 (Asn453Ser, rs1800440, C_11642651_30). Determination was performed according to instructions of manufacturer (Applied Biosystems). Quality control was performed by reanalysis of 10% of randomly selected samples. Results were 100% concordant. Oligonucleotide primers were synthesized by Generi Biotech (Hradec Kralove, Czech Republic).

Statistical analyses. Statistical analyses were processed by the statistical software CRAN 2.4.0. The mean, median, SD, variance, minimum, maximum, quartiles, frequencies and other basic statistical measurements were computed in given groups and subgroups. The overall survival of given groups and subgroups was determined using Kaplan-Meier's survival distribution functions. The Log-rank test was used for evaluation of different survivals among investigated groups and subgroups. For determination the risk factors in relation to overall survival Hazard Ratio was computed by the Cox proportional hazard model. Odds ratios (OR) and confidence intervals for examining the association between genetic factors and cancer risk were estimated by logistic regression.

Results

General characteristics of participants. 285 cases and 469 controls entered into the study. Among pancreatic cancer patients, there were 132 patients with histology-verified diagnosis. In 115 patients, the diagnosis was based on clinical symptoms. 38 patients were excluded from the study due to other than pancreatic cancer diagnosis (review process found 15 individuals with pancreatitis and 23 with other diagnosis). Randomly selected controls were healthy individuals and consisted of two independent groups: 179 healthy subjects recruited by general practitioners in Prague during the 3rd month after the cases recruitment, and 290 blood donors recruited from two centers in Prague and Pribram. Cases comprised of 39.6% females and 60.4% males whereas controls included either 46.4% females and 55.6% males (GP group) or 31.9% females and 68.1% males (BTS group). The difference in sex distribution between cases control groups was not statistically significant. The average age of cases was 61.4 ± 10.8 years vs. 59.2 ± 12.0 years in GP group and 40.0 ± 11.8 years in BTS group.

Clinical characteristics of the patients. The first manifestation of the disease was obstructive icterus in almost 70 % of patients whereas the rest usually reported pain and weight loss. About 34% of histology-verified cases underwent surgery

Table 1: Association of CYP1B1 polymorphisms with pancreatic cancer risk

	Cases, N (%)		Controls, N (%)	OR (95% CI) ^a	
	All	Histology-verified		All cases	Histology-verified
CYP1B1-432					
Leu/ Leu	91 (36.8)	55 (41.7)	131 (28.0)	reference	reference
Leu/Val	124 (50.2)	62 (47.0)	259 (55.3)	0.69 (0.49-0.97)	0.57 (0.38-0.87)
Val/Val	32 (13.0)	15 (11.3)	78 (16.7)	0.59 (0.36-0.96)	0.46 (0.24-0.86)
Leu/Val+	156	77	337	0.67 (0.48-0.97)	0.54 (0.36-0.81)
Val/Val					
qVal^b			0.44		
CYP1B1-453					
Asn/Asn	172 (69.6)	87 (66.0)	326 (69.5)	reference	reference
Asn/Ser	63 (25.5)	39 (28.5)	126 (26.9)	0.95 (0.67-1.35))	1.19 (0.75-1.79)
Ser/Ser	12 (4.9)	6 (4.5)	17 (3.6)	1.35 (0.63-2.86)	1.32 (0.51-3.45)
Asn/Ser+	75	45	143	0.99 (0.71-1.39))	1.18 (0.78-1.78)
Ser/Ser					
qSer^b			0.17		

^a OR=odds ratio, 95% CI=95% confidence interval

^b frequency of the rare allele in control group

of which about 50 % was radical surgery. The first palliative chemotherapy was predominantly gemcitabine. 5-Fluorouracil was used in the rest of anticancer therapy-treated patients. Due to the low performance status only 3 patients received II. line of palliative treatment (capecitabine or 5-fluorouracil).

Polymorphisms and pancreatic cancer risk. There were no significant differences in CYP1B1 rare allele frequencies and genotype distributions between GP and BTS control groups allowing us to pool these control groups for further analyses. Evaluation of genotype distribution and allele frequencies in cases and controls showed that carriers of rare genotype Val/Val in codon 432 of CYP1B1 were under significantly lower risk of pancreatic cancer than wild type carriers (Table 1, $p=0.035$). Carriers of heterozygous genotype ($p=0.033$) and rare allele Val ($p=0.015$) were also under lower risk than wild type carriers. The same was true for histology-verified patients when analyzed separately ($p=0.016$ for rare genotype, $p=0.009$ for heterozygotes, and $p=0.003$ for rare allele carriers vs. wild type carriers). On the contrary, CYP1B1 polymorphism in codon 453 did not significantly associate with pancreatic cancer risk (Table 1). There were not enough participants for analysis of combined effect of both CYP1B1 polymorphisms.

Overall survival. CYP1B1 polymorphisms did not significantly modify overall survival of either all pancreatic cancer patients or histology-verified subgroup of patients. Median survival of patients with rare genotype Val/Val in codon 432 of CYP1B1 was 1.73 year (95 % CI=0.66-1.34), with heterozygous genotype Val/Leu was 0.91 year (95 % CI=0.76-1.42) in comparison with wild-type Leu/Leu carriers (1.12 year 95 % CI=0.90-1.37). Median survival of patients with rare genotype Ser/Ser in codon 453 of CYP1B1 was 0.95 year (95 % CI=0.31-0.97), with heterozygous genotype Asn/Ser was

0.87 year (95 % CI=0.63-2.10) in comparison with wild-type Asn/Asn carriers (1.17 year; 95% CI=0.91-1.37). Median survival of histology-verified patients with CYP1B1-codon 432 genotypes Val/Val, Leu/Val, and Leu/Leu was 1.78 year 95 % CI=0.34-2.49), 0.87 year (95 % CI=0.58-1.42), and 1.12 year (95 % CI=0.85-2.65), respectively. Median survival of histology-verified patients with CYP1B1-codon 453 genotypes Ser/Ser, Asn/Ser, and Asn/Asn was 0.42 year (95 % CI=0.05-0.93), 0.87 year (95 % CI=0.48-1.77), and 1.17 year (95% CI=0.85-1.55), respectively.

Discussion

The risk factors leading to the pancreatic cancer development are poorly understood. Minority of these cancers can be linked to currently known hereditary cancer syndromes like syndrome of hereditary pancreatitis or hereditary breast-ovarian carcinomas, but generally no explanation for the majority of pancreatic carcinomas exists. Previous studies suggested that higher risk of pancreatic cancer may be associated with certain polymorphisms in metabolizing genes including CYPs. However, virtually no study was performed specifically on population of Czech origin or other Slavic ones. We focused our attention on two CYP1B1 polymorphisms frequently studied in sporadic cancers other than pancreatic.

In our study, a significant association between CYP1B1 polymorphism in codon 432 and the pancreatic cancer risk was observed. Histology-verified cases showed even more significant trend in the same direction, i.e. higher risk in carriers of wild type genotype in comparison with rare allele carriers ($p=0.003$). Recently, higher levels of 4-aminobiphenyl-hemoglobin adducts were observed in wild Leu allele carriers

in the *CYP1B1* codon 432 as compared to the rare genotype. A significant interaction between these *CYP1B1* genotypes and the level of exposure was found as well ($p=0.003$, ref. 17). Thus, the wild type allele which is more active than the rare one [18] may contribute to enhanced exposure-related damage of biomacromolecules and subsequently to carcinogenesis.

No association of the second studied polymorphisms in codon 453 with the risk was found in our study. The frequencies of rare *CYP1B1* alleles in our pooled control group ($n=469$) were similar to those published in other Caucasian populations (codon 432 – 0.45; ref. 19 and codon 453 – 0.18; ref. 5). Case-control study on role of *CYP1B1* polymorphisms in pancreatic cancer risk was not published so far. However, there were published studies on polymorphisms in other CYPs and metabolizing genes. Lee et al. [20] did not find any significant association of *CYP1A1*, *CYP2D6*, and *CYP2E1* haplotypes with pancreatic cancer risk in a small case-control study on Korean population. In contrast, another study reported that polymorphisms in *CYP1A2* and *NAT1* genes modify the risk of pancreatic cancer [21]. Moreover, a significant interaction between *NAT1* genotype and dietary mutagen intake modifying the risk of pancreatic cancer was observed among men but not women and suggested the existence of gender-specific susceptibility to dietary mutagen exposure [22]. Thus, polymorphisms in metabolic genes may modulate pancreatic cancer risk and present interesting topic for further studies.

We also examined the influence of both *CYP1B1* polymorphisms on the overall survival of the disease. Although non-significant, a trend towards longer survival of patients with rare genotype Val/Val in codon 432 of *CYP1B1* in comparison with patients carrying wild-type alleles was observed. There is lack of data in the literature to corroborate this result more thoroughly. Thus, due to the poor prognosis of pancreatic cancer patients and the frequent resistance of the disease to standard anticancer therapy, it seems that *CYP1B1* polymorphisms most probably lack prognostic significance.

In conclusion, the *CYP1B1* polymorphism in codon 432 seems to influence pancreatic cancer risk but not prognosis in the Czech population. As the data on genetic background of pancreatic cancer are inconsistent worldwide, further research is needed to find factors contributing to pancreatic cancer development and progression.

Acknowledgement. This work was supported by the Grant Agency of the Ministry of Health Czech Republic, No. 9422–3.

References

- [1] Cancer Incidence 2005 in the Czech Republic, IHIS CR, NOR CR, Czech Republic 2008, p62.
- [2] SHIMADA T, GILLAM EM, ODA Y, TSUMURA F, SUTTER TR et al. Metabolism of benzo[a]pyrene to trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 1B1 and purified liver epoxide hydrolase. *Chem Res Toxicol* 1999; 12: 623–9. [doi:10.1021/tx990028s](https://doi.org/10.1021/tx990028s)
- [3] KIM JH, STANDBURY KH, WALKER NJ, TRUSH MA, STRICKLAND PT, et al. Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1847–53. [doi:10.1093/carcin/19.10.1847](https://doi.org/10.1093/carcin/19.10.1847)
- [4] RODRIGUES-ANTONA C, INGELMAN-SUNDEBERG M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 2006; 25: 1679–91. [doi:10.1038/sj.onc.1209377](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209377)
- [5] BETHKE L, WEBB E, SELICK G, RUDD M, PENEGAR S, et al. Polymorphisms in the cytochrome P450 genes *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *CYP19A1* and colorectal cancer risk. *BMC Cancer* 2007; 7: 123. [doi:10.1186/1471-2407-7-123](https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-123)
- [6] WU MF, WU WJ, CHANG GC, CHEN CY, HU SW, et al. Increased expression of cytochrome P4501B1 in peripheral leukocytes from lung cancer patients. *Toxicol Lett* 2004; 150: 211–9. [doi:10.1016/j.toxlet.2004.01.006](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.01.006)
- [7] CHANG BL, ZHENG SL, ISAACS SD, TURNER A, HAWKINS GA, et al. Polymorphisms in the *CYP1B1* gene are associated with increased risk of prostate cancer. *Br J Cancer* 2003; 89: 1524–29. [doi:10.1038/sj.bjc.6601288](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601288)
- [8] SASAKI M, MASAHIRO Y, OKINO, ST, MITSU HARU N, SUGURU Y, et al. Polymorphisms of the *CYP1B1* Gene as Risk Factors for Human Renal Cell Cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2015–19. [doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0166](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0166)
- [9] KO Y, ABEI J, HARTH W, BRODE P, ANTONY C, et al. Association of *CYP1B1* Codon 432 Mutant Allele in Head and Neck Squamous Cell Cancer Is Reflected by Somatic Mutations of p53 in Tumor Tissue. *Cancer Res* 2001; 61: 4398–4404.
- [10] CROUS-BOU M, DE VIVO I, PORTA M, PUMAREGA JA, LOPEZ T, et al. *CYP1B1* Polymorphisms and K-ras Mutations in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1417–21. [doi:10.1007/s10620-008-0235-9](https://doi.org/10.1007/s10620-008-0235-9)
- [11] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=1545
- [12] STOILOV I, AKARSU AN, ALOZIE I, CHILD A, BAR-SOUM-HOMSY M, et al. Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 573–584. [doi:10.1086/301764](https://doi.org/10.1086/301764)
- [13] HANNA IM, DAWLING S, ROODI N, GUENGERICH FP, PARL FF, et al. Cytochrome P450 1B1 (*CYP1B1*) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. *Cancer Research* 2000; 60: 3440–344.
- [14] SHIMADA T, HAYES CL, YAMAZAKI H, AMIN S, HECHT SS, et al. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* 1996; 56: 2979–2984
- [15] SHIMADA T, WATANABE J, INOUE K, GUENGERICH FP, GILLAM EM, et al. Specificity of 17beta-oestradiol and benzo[a]pyrene oxidation by polymorphic cytochrome P4501B1 variants substituted at residues 48, 119 and 432. *Xenobiotica*. 2001; 31: 163–176 [doi:10.1080/00498250110043490](https://doi.org/10.1080/00498250110043490)
- [16] SUGIMURA H, CAPORASO NE, SHAW GL, MODALI RV, GONZALEZ FJ, et al. Human debrisoquine hydroxylase gene polymorphisms in cancer patients and controls. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1527–30. [doi:10.1093/carcin/11.9.1527](https://doi.org/10.1093/carcin/11.9.1527)

- [17] KETELSLEGGERS HB, GODSCHALK RW, ESKENS BJ, DALLINGA JW, GOTTSCHALK RW, et al. Potential role of cytochrome P450-1B1 in the metabolic activation of 4-aminobiphenyl in humans. *Mol Carcinog* 2009 Mar 9. [Epub ahead of print].
- [18] SHIMADA T, WATANABE J, INOUE K, GUENGERICH FP, GILLAM EM, et al. Specificity of 17beta-oestradiol and benzo[a]pyrene oxidation by polymorphic human cytochrome P4501B1 variants substituted at residues 48, 119 and 432. *Xenobiotica*. 2001; 31: 163–76. [doi:10.1080/00498250110043490](https://doi.org/10.1080/00498250110043490)
- [19] PARACCHINI V, RAIMONDI S, GRAM IT, KANG D, KOCABAS NA, et al. Meta- and pooled analyses of the cytochrome P-450 1B1 Val432Leu polymorphism and breast cancer: a HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 115–25. [doi:10.1093/aje/kwj365](https://doi.org/10.1093/aje/kwj365)
- [20] LEE HC, YOON YB, KIM CY Association between genetic polymorphisms of the cytochromes P-450 (1A1, 2D6, and 2E1) and the susceptibility to pancreatic cancer. *The Korean Journal of Internal Medicine* 1997; 12: 128–36.
- [21] Li D, JIAO L, Li Y, DOLL MA, HEIN DW, et al. Polymorphisms of cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferase genes, smoking, and risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27: 103–11. [doi:10.1093/carcin/bgi171](https://doi.org/10.1093/carcin/bgi171)
- [22] SUZUKI H, MORRIS JS, LI Y, DOLL MA, HEIN DW, et al. Interaction of the cytochrome P4501A2, SULT1A1 and NAT gene polymorphisms with smoking and dietary mutagen intake in modification of the risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1184–91. [doi:10.1093/carcin/bgn085](https://doi.org/10.1093/carcin/bgn085)



Contents lists available at ScienceDirect

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gen tox
 Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Short communication

The association between glutathione S-transferase gene polymorphisms and pancreatic cancer in a central European Slavonic population

D. Vrana^{a,b}, H. Pikhart^c, B. Mohelnikova-Duchonova^{a,d}, I. Holcatova^e, R. Strnad^f,
 A. Slamova^e, M. Schejbalova^e, M. Ryska^f, S. Susova^a, P. Soucek^{a,*}

^a Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42, Czech Republic^b Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine and Department of Oncology of the General Teaching Hospital, Czech Republic^c International Institute for Society and Health, Department of Epidemiology and Public Health, University College London, UK^d Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine, Czech Republic^e Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine, Institute of Hygiene and Epidemiology, Czech Republic^f Charles University in Prague, 2nd Faculty of Medicine and Central Military Hospital, Surgery Department, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2009

Received in revised form 28 August 2009

Accepted 4 September 2009

Available online 26 September 2009

Keywords:

Glutathione S-transferases

Pancreas

Cancer

Risk

ABSTRACT

In the first case-control study on pancreatic cancer conducted on 253 cases and 403 controls in the Czech Republic we observed that the *GSTP1*-codon 105 Val variant allele and the *GSTT1*-null genotype were associated with an elevated risk for pancreatic cancer (OR = 1.38; 95%CI = 0.96–1.97 and OR = 1.56; 95%CI = 0.93–2.61, respectively). Combination of *GSTT1*-null and *GSTP1*-codon 105 Val variants further increased the risk for pancreatic cancer (OR = 2.50; 95%CI = 1.20–5.20). In conclusion, this study suggests population-specific associations of polymorphisms in key biotransformation genes with elevated risk for pancreatic cancer.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The incidence of pancreatic cancer (ICD-10: C25) in the Czech Republic reached a total of 15.4 cases per 100,000 inhabitants in 2005 [1]. The majority of these cases are clinically silent until symptoms arise, such as dyspepsia, weight loss, epigastric pain radiating into the back, and jaundice. Despite significant efforts in therapy, the 5-year survival rate does not surpass 5% [2]. Pancreatic cancer rarely occurs in the young population. Most often it affects individuals between 45 and 85 years of age. Because of its growing incidence and high fatality rate, there is a strong need to identify risk factors that contribute to the onset of the disease. Approximately 4–16% of pancreatic cancers are attributed to a genetic predisposition (familial cases) due to germ-line mutations in highly penetrant genes [3]. These mutations involve genes contributing to the regulation of the cell cycle, tumor-suppressor genes as well as proto-oncogenes, such as *BRCA1/2* or *CDKN2A*, *CDKN2B*, etc. Nevertheless, the majority of pancreatic cancer cases occur in individuals without a prior family history (sporadic cases). Published risk factors include age, sex, diabetes, obesity, history of chronic pancreatitis, diet rich in

fat, tobacco, and infection by *Helicobacter pylori* [4,5]. Metabolism of environmentally important contaminants (both activation of pre-carcinogens and detoxification of carcinogens) may present an important susceptibility factor as well. Polymorphisms in genetically variable xenobiotic-metabolizing enzymes may modify the risk for carcinogenesis [6].

Glutathione S-transferases (GST, EC 2.5.1.18) *GSTM1* (OMIM: 138350), *GSTP1* (OMIM: 134660) and *GSTT1* (OMIM: 600436) are frequently studied in molecular epidemiology of cancer. Large genomic deletions of *GSTM1* and *GSTT1* (null genotype) produce a complete lack of enzyme activities. *GSTP1* polymorphism (Ile105Val, rs1695) generates an enzyme with different heat stability and substrate affinity [7]. *GSTP1* variants confer a possibly protective effect against pancreatic cancer in older individuals and a significant survival advantage in patients who received 5-fluorouracil [8]. Results of Ferraz et al. suggested that *GSTT1* and *GSTP1* could play a role in the occurrence of *TP53* mutations in colorectal cancer [9]. An interaction was reported between *XRCC1* (OMIM: 194360; Arg399Gln, rs25487) and *GSTT1/GSTM1-null/null* [10], and between *GSTT1-null* and cigarette smoking, which was more prominent among women than among men with pancreatic cancer [11].

In this study we evaluated whether *GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1* polymorphisms influence the risk for pancreatic cancer in a case-control study conducted in the Czech Republic, in a central

* Corresponding author. Tel.: +420 267082711; fax: +420 267311236.
 E-mail address: psoucek@szu.cz (P. Soucek).

European, predominantly Slavonic population. Special attention was paid to the effect of gene combinations, age, sex, and smoking status.

2. Patients and methods

2.1. Study population

The association between pancreatic cancer risk and genetic polymorphisms was investigated in a case-control study. A total of 768 participants were recruited in the period between September 2004 and February 2008. Cases were incident pancreatic cancer patients from five oncology and surgery departments in Prague. Pancreatic cancer diagnosis was periodically reconfirmed. Patients were eligible for the study when they fulfilled at least one of the following criteria: (a) histologically or cytologically confirmed pancreatic adenocarcinoma or (b) at least three of the clinical signs of pancreatic cancer (ERCP, EUS with FNAB, mass on CT or MRI, weight loss, anorexia/cachexia, obstructive jaundice). Among cases, there were 136 patients with histological verification and 117 patients with clinically verified diagnosis. Thirty-eight other patients (potential cases) were excluded from the study due to other than pancreatic cancer diagnosis (15 individuals with pancreatitis and 23 individuals with other diagnoses). Seven further cases were excluded as variables needed for the analysis (such as age) were not available to the investigators. Randomly selected controls were healthy individuals from two independent groups: 179 healthy subjects recruited by general practitioners in Prague during the same period as the case recruitment, and 224 blood donors from two centers, in Prague and Pribram. Controls had a similar sex and age distribution as cases. Personal data were collected by face-to-face interview using a structured questionnaire (data such as short occupational history, smoking habits, education, reproductive history and nutritional information). In addition, clinical data were collected from medical records (date of diagnosis, stage, grade and histology where available). Sixty-seven controls were excluded because variables needed for the analysis were missing. At the end of study period we had 253 cases and 403 controls included into the study, for whom blood samples and filled questionnaires were available. Written informed consent to participate in the study was obtained from all participants. The study was approved by the Ethical Committee of the 1st Medical Faculty of Charles University, Prague, Czech Republic.

2.2. Genotyping

Blood was collected during diagnostic procedures using tubes with K₃EDTA anticoagulant. DNA was isolated from lymphocytes using the phenol/chloroform extraction method as described earlier [12]. The *GSTP1*-codon 105 polymorphism was assayed by use of allelic discrimination with the TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay (rs1695, kit no.: C.3237198.20, Applied Biosystems, Foster City, CA) with real-time PCR in RotorGene 6000 (Corbett Research, Brisbane, Australia). Determination was performed according to instructions provided by the manufacturer (Applied Biosystems). Deletion polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* were assessed by allele-specific multiplex PCR [13]. Quality control was performed by reanalysis of 10% randomly selected samples. Results were fully concordant. Oligonucleotide primers for *GSTM1* and *GSTT1* analyses were synthesized by Generi Biotech (Hradec Kralove, Czech Republic). Genotyping could not be done on all subjects: data on *GSTM1* were available for 253 cases and 403 controls, on *GSTP1* for 253

cases and 402 controls, and on *GSTT1* for 244 cases and 347 controls. Unsuccessful genotyping of *GSTT1* was caused by inadequate quality or quantity of DNA (lack of control PCR product).

2.3. Statistical analysis

Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) for examining the association between genetic factors and cancer risk were estimated by logistic regression. Age, sex, smoking status (current smoker, past smoker, never smoker) and education (primary or less, vocational, secondary, higher) were used as potential confounding factors or effect modifiers (interaction term used in the regression model) in adjusted analysis. Potential gene-gene interactions were tested in a further step. The likelihood-ratio test was used to test the significance of the main effects, potential effect modifications and gene-gene interactions. For each analysis (depending on the genetic variable/s used) the maximal dataset was used, including all available data were used. A two-sided $p < 0.05$ would be considered significant. All analyses were conducted with Stata 10 software (Stata Corp, TX, USA).

3. Results

There were 253 cases and 403 controls aged 25 years and older in the dataset (age range 25–87 years). The main characteristics of the study population are presented in Table 1. There were no significant differences in age and sex distribution between cases and controls.

The *GSTP1*-codon 105 Val allele and the *GSTT1*-null genotype were associated with increased pancreatic cancer risk in unadjusted analyses (results not shown). Because no statistically significant heterogeneity was found, both control groups were pooled together for further analysis. In Table 2 the results are given for all subjects and for younger and older individuals separately. While the interaction between genotypes and age was not significant (p -values 0.15, 0.61 and 0.99 for age interaction with *GSTP1*, *GSTT1* and *GSTM1*, respectively), the magnitude of the effect seems to differ by age. In particular, the effect of the combination *GSTT1*-*GSTP1* seems to differ per age group, being stronger in subjects younger than 50 years (however, the p -value for interaction with age is 0.47). In addition, it seems possible that the effect of *GSTT1*-*GSTP1* among individuals younger than 50 years differs by sex: the odds ratio (OR) for null-Ile/Val or null-Val/Val combination vs. present-Ile/Ile combination is 2.35 in men and 7.36 in women, but the numbers are small and neither the main effects nor the interaction are statistically significant (results not shown). No statistically significant interaction of the studied polymorphisms with smoking was found (while the main effect of smoking was borderline significant with an OR between 1.4 and 1.7 depending on genotype used

Table 1
Descriptive characteristics of the study groups.

Characteristics		Total	Cases	Controls	P -value*
		N (%)	N (%)	N (%)	
Age	<40 years	114 (17.4)	40 (15.9)	74 (18.3)	<0.001
	40–50	126 (19.2)	22 (8.7)	104 (25.7)	
	50–60	173 (26.4)	48 (19.1)	125 (30.9)	
	60–70	149 (22.7)	86 (34.1)	63 (15.6)	
	70–80	68 (10.4)	44 (17.5)	24 (5.9)	
	80+	26 (4.0)	12 (4.8)	14 (3.5)	
Sex	Men	410 (61.6)	156 (61.9)	254 (62.9)	0.85
	Women	246 (38.4)	96 (38.1)	150 (37.1)	
Smoking status	Never	244 (37.2)	83 (32.9)	161 (39.9)	<0.001
	Past smoker	193 (29.4)	71 (28.2)	122 (30.2)	
	Current smoker	171 (26.1)	57 (22.6)	114 (28.2)	
	Status unknown	48 (7.3)	41 (16.3)	7 (1.7)	
Education	Primary or less	111 (15.2)	63 (24.2)	48 (10.2)	<0.001
	Vocational	225 (30.8)	70 (26.9)	155 (33.0)	
	Secondary	260 (35.6)	69 (26.5)	191 (40.6)	
	Higher	112 (15.3)	42 (16.2)	70 (14.9)	
	Unknown	22 (3.0)	16 (6.2)	6 (1.3)	

* Chi-square test for the association between exposure and outcome.

Table 2
Glutathione S-transferases and age interaction in pancreatic cancer (only subjects with complete data).

Gene/genotype	Cases, N (%)	Controls, N (%)	All subjects OR (95%CI) ^a	<50 years		≥50 years	
				N	OR (95%CI) ^a	N	OR (95%CI) ^a
<i>GSTM1</i>							
Present	115 (45.5)	188 (46.7)	1.00 (reference)	114	1.00 (reference)	189	1.00 (reference)
Null	138 (54.6)	215 (53.4)	0.92 (0.64–1.31)	125	0.85 (0.39–1.89)	228	0.90 (0.59–1.36)
N total	253	403					
<i>GSTT1</i>							
Present	199 (81.6)	308 (88.8)	1.00 (reference)	181	1.00 (reference)	326	1.00 (reference)
Null	45 (18.4)	39 (11.2)	1.56 (0.93–2.61)	27	1.13 (0.33–3.93)	57	1.66 (0.91–3.04)
N total ^b	244	347					
<i>GSTP1</i> -codon 105							
Ile/Ile	100 (39.5)	192 (47.8)	1.00 (reference)	116	1.00 (reference)	176	1.00 (reference)
Ile/Val or Val/Val	153 (60.5)	210 (52.2)	1.38 (0.96–1.97)	123	3.09 (1.25–7.63)	240	1.23 (0.81–1.87)
N total ^b	253	402					
<i>GSTT1</i> - <i>GSTP1</i> interaction							
Present-Ile/Ile	76 (31.3)	146 (42.1)	1.00 (reference)	89	1.00 (reference)	133	1.00 (reference)
Null-Ile/Ile	18 (7.4)	21 (6.0)	1.46 (0.97–2.18)	13	0.77 (0.10–5.67)	26	1.69 (0.69–4.13)
Present-Ile/Val or Val/Val	123 (50.6)	162 (46.7)	1.46 (0.69–3.12)	92	3.00 (1.15–7.82)	193	1.31 (0.81–2.09)
Null-Ile/Val or Val/Val	26 (10.7)	18 (5.2)	2.50 (1.20–5.20)	14	4.40 (0.79–24.7)	30	2.21 (0.95–5.15)
N total ^b	243	347					

^a Adjusted for age, sex, smoking status and education.

^b Missing genotypes due to inadequate quality or quantity of DNA.

in the analysis). When adjusted for education, the results remained virtually unchanged.

4. Discussion

Pancreatic cancer has typically a poor prognosis and a very high mortality. The etiology and molecular pathogenesis of this cancer are still poorly understood. Besides alterations of high-penetrance genes, interaction of environmental factors with low-penetrance genes is suspected to contribute to the onset of pancreatic cancer. We aimed to investigate the contribution of well-characterized and functionally relevant polymorphisms in *GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1* to susceptibility to pancreatic cancer. To this end, a case-control study was conducted among a central-European population with one of the highest incidences of this type of cancer in the western world. Age and smoking, the published strong risk factors for pancreatic cancer [14,15] were followed as possible interacting factors.

Although the *GSTM1*-null genotype is a suspected risk factor in lung cancer [16], according to our results it is unlikely that it influences the risk for pancreatic cancer. Our observation is in concordance with previously published studies [8,10,17].

We observed that the *GSTP1*-codon 105 Val variant allele was associated with elevated pancreatic cancer risk (3.09-fold) in individuals younger than 50 years of age. Our study supports the previously proposed role of *GSTP1* polymorphism in pancreatic pathogenesis [8]. However, Jiao et al. suggested that individuals aged 62 years or older who carried the *GSTP1**C (codon 105 Val-codon 114 Val)-containing genotype tended to have a reduced risk compared with younger individuals who carried the non-*C genotype (OR=0.54, CI=0.29–1.02, ref. [8]). Thus, there is a clear discrepancy between both studies: we found an association of *GSTP1*-codon 105 with pancreatic cancer risk in individuals younger than 50 years, but Jiao et al. found association in individuals aged 62 or older. Both observations may be result of small sample sizes, effect of other genes and/or genotypes not analyzed in these studies, or a different study design.

We found that the *GSTT1*-null genotype was associated with an increased risk for pancreatic cancer (1.56-fold, non-significant) in

the adjusted analyses. This effect was evident in individuals aged 50 or older (1.66-fold, non-significant) but not in younger subjects. The first study of this kind found no association of *GSTT1*-null with pancreatic cancer [17]. However, Duell et al. suggested that the combination of heavy smoking and a deletion polymorphism in *GSTT1* is associated with an increased risk for pancreatic cancer among Caucasians, with the association possibly being stronger in women than in men [11]. In our study, smoking did not interact with any of the genes studied, both in adjusted and stratified analyses.

The combination of *GSTT1* and *GSTP1* had a multiplicative effect on the risk for pancreatic cancer, the association being significant when all subjects were analyzed together (OR, 2.5). There is no statistical evidence for a departure from multiplicativity of the association (*p*-value 0.76 for gene–gene interaction).

Our study has a limitation in the fact that although our time for data collection was long, the sample size is still relatively small. The power of the study for gene–gene interactions and stratified analyses was low and it can be assumed that the probability of chance findings in these analyses was quite high. It is essential to use multi-centric design in the future to collect data on large numbers of cases for such analysis. Among other limitations, the presumed genetic variability and phenotypic heterogeneity of tumors in patient populations should be mentioned. A study of a homogeneous (at least pathologically) population of patients is, however, almost impossible due to the difficulties with recruitment of pancreatic cancer cases with a rather short survival and poor performance status. Additionally, in inoperable patients (the majority in pancreatic cancer) the verification of diagnosis is complicated by the lack of a pathological specimen. In our study, familial cases based on family history were not distinguished from sporadic cases. However, due to the fact that familial pancreatic cancer is very rare, it is unlikely that the unknown hereditary genetic background of patients would have had a high impact on the study findings.

To our knowledge we here present the first study that evaluates the role of GST polymorphisms in pancreatic cancer in a Slavonic population. Conflicting results in comparison with few published

data warrant further research and similar studies in related populations of Caucasian origin.

Conflict of interest

None.

Acknowledgement

This work was supported by the Grant Agency of the Ministry of Health Czech Republic, grants No. 8563-5 and 9422-3.

References

- [1] Cancer Incidence 2005 in the Czech Republic, IHIS CR, NOR CR, Czech Republic 2008, p. 62.
- [2] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, et al., Cancer statistics, 2008, *CA Cancer J. Clin.* 58 (2008) 71–96.
- [3] A. Maitra, R.H. Hruban, Pancreatic cancer, *Annu. Rev. Pathol.* 3 (2008) 157–188.
- [4] J. Everhart, D. Wright, Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A: metaanalysis, *JAMA* 273 (1995) 1605–1609.
- [5] V. Mukesh, Pancreatic cancer epidemiology, *Technol. Cancer Res. Treat.* 4(2005) 295–301.
- [6] C. Kiyohara, Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of colorectal cancer, *J. Epidemiol.* 10 (2000) 349–360.
- [7] P. Zimniak, B. Nanduri, S. Pikula, J. Bandorowicz-Pikula, Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties, *Eur. J. Biochem.* 224 (1994) 893–899.
- [8] L. Jiao, M.L. Bondy, M.M. Hassan, et al., Glutathione S-transferase gene polymorphisms and risk and survival of pancreatic cancer, *Cancer* 109 (2007) 840–848.
- [9] J.M. Ferraz, F. Zinzindohoué, T. Lecomte, et al., Impact of GSTT1, GSTM1, GSTP1 and NAT2 genotypes on KRAS2 and TP53 gene mutations in colorectal cancer, *Int. J. Cancer* 110 (2004) 183–187.
- [10] E.J. Duell, E.A. Holly, P.M. Bracci, J.K. Wiencke, K.T. Kelsey, A population-based study of the Arg399Gln polymorphism in X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) and risk of pancreatic adenocarcinoma, *Cancer Res.* 62 (2002) 4630–4636.
- [11] E.J. Duell, E.A. Holly, P.M. Bracci, M. Liu, J.K. Wiencke, K.T. Kelsey, A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk, *J. Natl. Cancer Inst.* 94 (2002) 297–306.
- [12] H. Sugimura, N.E. Caporaso, G.L. Shaw, et al., Human debrisoquine hydroxylase gene polymorphisms in cancer patients and controls, *Carcinogenesis* 11 (1990) 1527–1530.
- [13] V. Nedelcheva-Kristensen, T.I. Andersen, B. Erikstein, et al., Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients, *Pharmacogenetics* 8 (1998) 441–447.
- [14] A.R. Hart, H. Kennedy, I. Harvey, Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 6 (2008) 275–282.
- [15] R. Lochan, A.K. Daly, H.L. Reeves, R.M. Charnley, Genetic susceptibility in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Br. J. Surg.* 95 (2008) 22–32.
- [16] C. Carlsten, G.S. Sagoo, A.J. Frodsham, W. Burke, J.P. Higgins, Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and lung cancer: a literature-based systematic HuGE review and meta-analysis, *Am. J. Epidemiol.* 167 (2008) 759–774.
- [17] G. Liu, P. Ghadirian, D. Vesprini, et al., Polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 and risk of pancreatic adenocarcinoma, *Br. J. Cancer* 82 (2000) 1646–1649.

Genotype and haplotype analysis of *TP53* gene and the risk of pancreatic cancer: an association study in the Czech Republic

A.Naccarati¹, B.Pardini¹, V.Polakova¹, Z.Smerhovsky^{2,3},
L.Vodickova^{1,2}, P.Soucek², D.Vrana^{2,4}, I.Holcatova⁵,
M.Ryska⁶ and P.Vodicka^{1,*}

¹Department of Molecular Biology of Cancer, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of Czech Republic, Videnska 1083, 14200 Prague, Czech Republic, ²Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 10042 Prague, Czech Republic, ³Second Medical Faculty, Charles University in Prague, V uvalu 84, 15006 Prague, Czech Republic, ⁴Department of Oncology of the General Teaching Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Katerinska 32, Prague 2, 128 08 Czech Republic, ⁵First Faculty of Medicine, Institute of Hygiene and Epidemiology, Charles University in Prague, Katerinska 32, 12800 Prague, Czech Republic and ⁶Department of Surgery, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Central Military Hospital, V uvalu 84, 15006 Prague, Czech Republic

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +420 2 41062694;
Fax: + 420 2 41062782;
Email: pvodicka@biomed.cas.cz

Pancreatic carcinoma is the fourth leading cause of cancer-related deaths in the Czech Republic, with only a minimum of patients surviving 5 years. The aetiology and molecular pathogenesis are still weakly understood. *TP53* has a fundamental role in cell cycle and apoptosis and is frequently mutated in solid tumours, including pancreatic cancer. Based on the assumption that genetic variation may affect susceptibility to cancer development, the role of *TP53* polymorphisms in modulating the risk of pancreatic cancer may be of major importance. We investigated four selected polymorphisms in *TP53* (rs17878362:A₁>A₂, rs1042522:G>C, rs12947788:C>T and rs17884306:G>A) in association with pancreatic cancer risk in a case–control study, including 240 cases and controls (for a total of 1827 individuals) from the Czech Republic. Carriers of the variant C allele of rs1042522 polymorphism were at an increased risk of pancreatic cancer [odds ratio (OR) 1.73; 95% confidence interval (CI) 1.26–2.39; *P* = 0.001]. Haplotype analysis showed that in comparison with the most common haplotype (A₁GCG), the A₂CCG haplotype was associated with an increased risk (OR 1.39; 95% CI 1.02–1.88; *P* = 0.034) and the A₁CCG with a reduced risk (OR 0.30; 95% CI 0.12–0.76; *P* = 0.011) for this cancer. These results reflect previous findings of a recent association study, where haplotypes constructed on the same *TP53* variants were associated with colorectal cancer risk [Polakova *et al.* (2009) Genotype and haplotype analysis of cell cycle genes in sporadic colorectal cancer in the Czech Republic. *Hum. Mutat.*, 30, 661–668.]. Genetic variation in *TP53* may contribute, alone or in concert with other risk factors, to modify the inherited susceptibility to pancreatic cancer, as well as to other gastrointestinal cancers.

Introduction

Pancreatic cancer (International Classification of Diseases for Oncology-10: C25; Online Mendelian Inheritance in Man: 260350) is one of the most common malignancies of the gastrointestinal tract (1). More than 230 000 cases are diagnosed worldwide annually, mainly in developed countries and with a slight male predominance (2). This cancer is among the most fatal cancers with a 5 year survival rate of $\leq 6\%$ (3).

Pancreatic cancer is a complex disease, with both genetic and environmental factors contributing to its aetiology. A number of risk factors such as smoking, diabetes and chronic pancreatitis have been

identified in case–control and cohort studies, whereas the role of other factors remains to be elucidated (4).

The observed familial aggregation of the disease is evidence of a genetic component in pancreatic cancer (5,6): up to 10% of patients report a family history of pancreatic cancer (7). It is generally accepted that, as is the case of other complex diseases, more common genetic variants with modest effects on the risk of pancreatic cancer may play an important role in both familial and sporadic forms of this disease, either individually or in combination with environmental factors. The relatively high frequency of such variants may be an additional reason to potentially explain a substantial proportion of disease risk. Recently, Milne *et al.* (4) reviewed the findings from genetic association studies on the risk of pancreatic cancer but at present, results are still inconclusive, mainly due to the small study size and the selection of candidate genes.

TP53 (Online Mendelian Inheritance in Man: 191170) is a key player in stress responses that preserve genomic stability, responding to a variety of insults, including DNA damage, hypoxia, metabolic stress and oncogene activation (8). *TP53* also interacts with numerous cellular proteins, including several in the control programmed cell death. Above molecular interactions might contribute to its inhibitory role in the tumorigenesis. *TP53* is frequently mutated in various solid tumours, including colorectal and pancreatic cancer, and these mutations result in the absence or dysfunction of the p53 protein (9). This tumour suppressor gene is also polymorphic; so far, >200 single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified (<http://p53.free.fr>). In contrast to tumour-associated mutations, most of these SNPs are unlikely to have biological effects. Owing to the importance of *TP53* in tumour suppression, the SNPs that may alter p53 function might affect cancer risk, progression and/or response to treatment (8). However, the role of polymorphisms in this gene has not yet been fully investigated for pancreatic cancer susceptibility.

Previously, we have studied the effect of *TP53* common variants on colorectal cancer (CRC) risk in a case–control study in the Czech Republic and we have observed a differential distribution of major haplotypes between cases and controls, suggesting that prevalent haplotypes within the *TP53* gene may modulate CRC risk (10). In the present study, we carried out a hospital-based case–control study to evaluate the association of the same polymorphisms within *TP53* gene with the risk of pancreatic cancer. Due to the important role of *TP53* in tumorigenesis, we also aimed to investigate whether specific haplotypes within this gene may impact the cancer development risk, not only for CRC but also for pancreatic cancer.

Materials and methods

Subjects

A total of 1827 controls and 240 cases were included in the present study. Both cases and cancer-free controls were of Czech Caucasian origin, recruited between September 2004 and February 2008.

Cases were newly diagnosed patients attending five oncology and surgery departments providing specialized health care for pancreatic cancer within the Central Bohemia region and Prague. Therefore, reasonably, all incident cases occurring in the studied area were included in the time period. They represent both the urban and the rural Czech population. Pancreatic cancer diagnosis in patients was periodically reconfirmed both histologically and clinically (as described in refs 11 and 12). From the original set of 278 cases with clinical sign of pancreatic cancer, 38 patients were excluded due to other diagnosis (15 pancreatitis and 23 other diagnosis) during follow-up, leaving 240 cases in the study. Clinical–pathological data on patients were collected from their medical records (date of diagnosis, stage, grade and histology where available). Since a positive family history of pancreatic cancer is recognized being among risk factors for this cancer, we have investigated this parameter in our population. Of the studied cases, only two individuals, aged 56 and 74 years, presented one relative with a pancreatic cancer history. However, it has been estimated that a hereditary component may contribute only to 5–10% of the total pancreatic cancer cases (13).

Abbreviations: CI, confidence interval; CRC, colorectal cancer; LD, linkage disequilibrium; OR, odds ratio; SNPs, single nucleotide polymorphisms.

For the control group, we included cancer-free subjects previously recruited for CRC studies. This group consists of 611 individuals admitted to five large gastroenterological departments (Prague, Brno, Jihlava, Liberec and Pribram), which represent rural as well as urban regions all over the Czech Republic during time period of case sampling. Details of the recruitment procedure were described elsewhere (10,14). These subjects underwent colonoscopy for various gastrointestinal complaints. Due to the high incidence of CRC in the Czech Republic, colonoscopy is largely recommended and practiced. Besides CRC malignancy and idiopathic bowel diseases, the medical examination excluded the presence of other apparent cancers. To reduce selection bias, only those subjects with no previous malignant diagnosis were included in the study.

In addition to subjects with negative colonoscopy, we have collected healthy individuals from voluntary blood donors. All individuals ($n = 1216$) were subject to standard examinations to verify their health status for blood donation (details provided in ref. 12). Also, for this group, a medical examination could exclude the presence of any apparent malignancy. The sample collection was performed at the same time as that of the other two study groups described previously.

Basic epidemiological data on all participants were collected from a face-to-face questionnaire survey (personal and family history, short occupational history, smoking and drinking history, history of physical activity, reproductive history and nutritional information). All participants were informed and gave their written consent to participate in the study. The design of the study was approved by the Ethical Committee of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic, and by the Ethical Committee of the Institute of Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

Selection of polymorphisms

The polymorphisms within the TP53 gene were selected using a tag-SNP approach (as described in ref. 10). Phased SNP data set was obtained from the SNP500 cancer project (<http://snp500cancer.nci.nih.gov>), where 19 SNPs with minor allele frequency >5% have been genotyped in >30 Caucasians. Phased haplotypes were analysed with Haploview software [<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>; (15)]. Using the ‘four gamete rule’, the TP53 locus showed two blocks of linkage disequilibrium (LD): one spanning more than half of the first intron and the other encompassing all the remaining parts of the gene. We focused on the latter LD block as it contains all the exons where usually somatic mutations are induced in cancers. Thus, we analysed the SNPs from rs8079544 (located at the end of the intron 1) to rs35659787 (located at the beginning of the 3’-untranslated region), for a total of 12 SNPs. Setting the minor allele frequency at 0.03 with a R² threshold at 0.7, three tag SNPs were obtained that included rs1042522:G>C (Ex4+119 G>C, Arg72Pro), rs12947788:C>T (IVS7+72 C>T) and rs17884306:G>A (Ex11-363 G>A). In the study, we also included the 16 bp insertion/deletion polymorphism within the intron 3 (rs17878362:A₁>A₂, PIN3, Ins11951_11966, in which the A₂ allele carries the 16 bp insertion within the intron 3), as it is one of the most frequently analysed in association with cancer risk.

DNA isolation and genotyping

Blood was collected during diagnostic procedures using tubes with K₃EDTA anticoagulant. Genomic DNA was extracted from peripheral lymphocytes using a BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Valencia, CA) by KingFisher mL automated system (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) according to the procedure supplied by the manufacturer.

The polymorphisms in the TP53 gene were genotyped by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism as described in ref. 10. The genotype screening was performed simultaneously for cases and controls. The results were regularly confirmed by random re-genotyping of >10% of the samples for each polymorphism, which yielded concordant results. The genotypes with ambiguous and/or no results were excluded from the data set (the genotype completion rate was 99%).

Statistical analyses

Statistical calculations were performed using SPSS v13.0 for Windows (Chicago, IL). Genotype distribution for each polymorphism was tested for Hardy–Weinberg equilibrium in controls and differences in expected and observed frequencies were tested for statistical significance by Pearson chi-square test. Differences in baseline socio-demographic characteristics between cases and controls were analysed using chi-square test and Student’s *t*-test. Bivariate logistic regression was used to examine the association between variant alleles, genotypes and risk of pancreatic cancers. Odds ratio (OR), 95% confidence interval (CI) and *P*-values calculated for risk-associated genotypes and variant alleles were adjusted for age and gender, smoking habit and body mass index. The haplotype frequencies in cases and controls and the haplotypes carried by each individual (diplotype) were estimated with the FastPHASE v1.2.3 software module using the algorithm developed by Stephens *et al.* (16,17). The analysis was carried out to examine the phase of TP53 polymorphisms using the expectation–maximization algorithm to generate maximum likelihood estimates of haplotype frequencies. Relationships between genotype/haplotypes and the disease risk were summarized as global *P*-values. LD was calculated with free software available at <http://www.oege.org/software/cubex/> (18).

Relationships between genotype/haplotypes and the disease risk were summarized as global *P*-values. LD was calculated with free software available at <http://www.oege.org/software/cubex/> (18).

Results

Study population

The overall study population included 240 pancreatic cases and 1827 controls. The distribution of the considered covariates did not differ between the patients and the controls for gender, but there was a significant difference in age distribution. For this reason, a subset of 743 controls was randomly selected by frequency matching in a ratio 3:1 by 5 year age with cases. Details of cases and matched controls are shown in Table I. The same statistical analysis was applied considering the whole control group and the matched controls.

Allelic and genotype frequencies

The distribution of genotypes within the TP53 gene in the controls (both whole controls and frequency-matched controls) was in agreement with the Hardy–Weinberg equilibrium. Table II shows the allelic and genotype frequencies for each TP53 investigated common variants. The results of unconditional logistic regression showed a significant difference between cases and matched controls in the allelic and genotype frequencies for rs1042522:G>C polymorphism. In particular, carriers of the heterozygous genotype and carriers of the C allele were at an increased risk of developing pancreatic cancer (OR 1.73; 95% CI 1.26–2.39; *P* = 0.001). Similar results were observed also when cases were compared with the whole control group (data not shown).

Haplotype/diplotype analyses

The analysis of LD for the four loci in the TP53 gene is shown in Figure 1. Of the 16 possible haplotypes, 10 were detected in the matched controls and 8 in the cases. In comparison with the most common haplotype including only common alleles (A₁GCG), the A₂CCG haplotype was associated with a statistically significant increased risk of pancreatic cancer (OR 1.39; 95% CI 1.02–1.88; *P* = 0.034). On the other hand, a less frequent haplotype (A₂GCG) was associated with a significant decreased risk (OR 0.30; 95% CI 0.12–0.76; *P* = 0.011; Table III).

Similar results were observed when the haplotype distribution was analysed between pancreatic cancer cases and the whole control group (A₂CCG versus A₁GCG: OR 1.34; 95% CI 1.02–1.77; *P* = 0.035 and A₂GCG versus A₁GCG: OR 0.36; 95% CI 0.15–0.90; *P* = 0.028).

Table I. Characteristics of the study population

	Controls ^a (<i>n</i> = 743)	Cases (<i>n</i> = 240)	<i>P</i>
Age at diagnosis (years)			
Mean ± SD	60.5 ± 10.7	62.2 ± 10.4	0.03
Range	32–85	31–84	
Gender (%)			
Females	319 (42.9)	92 (38.3)	0.23
Males	424 (57.1)	148 (61.7)	
BMI (%)			
<18.5	1 (0.2)	10 (5.5)	<0.001
18.5–25	176 (29.8)	90 (49.7)	
25–30	269 (45.6)	56 (30.9)	
30–35	115 (19.5)	17 (9.4)	
35–40	24 (4.1)	6 (3.3)	
>40	5 (0.8)	2 (1.1)	
Smoking habit (%)			
Non-smokers	311 (52.3)	72 (36.7)	<0.001
Former smokers (>10 years)	121 (20.3)	35 (17.9)	
Former smokers (<10 years)	29 (4.9)	30 (15.3)	
Smokers	134 (22.5)	59 (30.1)	

BMI, body mass index.

^aHereby are reported only data about the matched control group.

Table II. Distribution of *TP53* genotypes and results of binary logistic regression analysis^a

<i>TP53</i> genotypes	Controls (<i>n</i> = 743) ^b	Cases (<i>n</i> = 240) ^b	OR	95% CI	<i>P</i> -value	chi-square and <i>P</i> -values Hardy–Weinberg equilibrium ^c
rs17878362:A ₁ >A ₂ ^d						
A ₁ A ₁	524	165	1.00	—	0.83	2.77, 0.25
A ₁ A ₂	207	70	1.02	0.72–1.44		
A ₂ A ₂	12	5	1.66	0.54–5.05		
A ₁ A ₂ + A ₂ A ₂	219	75	1.05	0.75–1.47	0.78	
A ₁ -allele	1255	400	1.00	—		
A ₂ -allele	231	80	1.09	0.82–1.43	0.56	
rs1042522:G>C						
GG	369	88	1.00	—	<0.001	0.72, 0.70
GC	316	131	1.79	1.29–2.49		
CC	58	19	1.43	0.78–2.62		
GC + CC	374	150	1.73	1.26–2.39	0.001	
G-allele	1054	307	1.00	—		
C-allele	432	169	1.34	1.08–1.67	0.008	
rs12947788:C>T						
CC	657	212	1.00	—	0.97	0.11, 0.95
CT	82	26	1.08	0.66–1.78		
TT	2	1	0.38	0.01–14.49		
CT + TT	84	27	1.06	0.64–1.73	0.83	
C-allele	1396	450	1.00	—		
T-allele	86	28	1.01	0.65–1.57	1	
rs17884306:G>A						
GG	649	211	1.00	—	0.67	0.26, 0.88
GA	87	26	0.98	0.59–1.61		
AA	2	0	—	—		
GA + AA	89	26	0.97	0.58–1.60	0.89	
G-allele	1385	448	1.00	—		
A-allele	91	226	0.88	0.56–1.38	0.59	

BMI, body mass index.

Significant *P*-values are in bold.

^aAdjusted for gender, age, BMI and smoking habit.

^bNumbers may not add up to 100% of subjects due to genotyping failure. All samples that did not give a reliable result in the first round of genotyping were resubmitted to up to three additional rounds of genotyping. Data points that were still not filled after this procedure were left blank.

^cChi-square and *P*-values for the deviation of observed and the numbers expected from the Hardy–Weinberg equilibrium in the controls.

^dAllele A₂ carries the 16 bp insertion within the intron 3.

rs17878362:A ₁ >A ₂	rs1042522:G>C	rs12947788:C>T	rs17884306:G>A	
1	0.693 (0.210)	1 (0.013)	0.888 (0.009)	rs17878362:A ₁ >A ₂
	1	0.706 (0.083)	0.793 (0.090)	rs1042522:G>C
		1	0.98 (0.004)	rs12947788:C>T
			1	rs17884306:G>A

Fig. 1. Linkage disequilibrium $|D'|$ (R^2) between polymorphisms in the *TP53* gene.

In this case, also the A₁CCG haplotype was associated with an increased risk of cancer (OR 1.58; 95% CI 1.13–2.21; *P* = 0.008; data not shown).

The difference in distribution of the *TP53* haplotypes between cases and controls was statistically significant only when all the controls were included in the study (global *P*-value for the haplotype effect was 0.042), whereas for the matched controls global *P*-value for the haplotype effect was 0.073.

The main associations observed in the haplotype analysis have also remained in the diplotype analyses (Table III). In particular, we observed that carriers of at least one A₂CCG haplotype were at moderate increased risk for pancreatic cancer in comparison with the individuals carrying the homozygous A₁GCG/A₁GCG diplotype. On the other hand, carriers of at least one A₂GCG haplotype showed a decreased risk for pancreatic cancer when compared with the referent diplotype including the most common haplotype.

Table III. Haplotype and diplotype distribution of the four investigated TP53 polymorphisms in pancreatic patients and control subjects

Haplotype ^a	Controls (n) ^b	Cases (n) ^b	OR	95% CI	P-value ^c	Diplotype ^a	Controls (n)	Cases (n)	OR ^d	95% CI	P-value
A ₁ GCG	956	301	1.00	—	—	A ₁ GCG/A ₁ GCG	280	83	1.00	—	—
A ₂ CCG	167	73	1.39	1.02–1.88	0.034	A ₂ CCG/any	158	69	1.47	1.01–2.14	0.05
A ₁ CCG	131	47	1.14	0.80–1.63	0.474	A ₁ CCG/any	125	45	1.21	0.80–1.85	0.38
A ₁ CCA	72	26	1.15	0.72–1.83	0.565	A ₁ CCA/any	70	28	1.25	0.75–2.09	0.42
A ₁ CTG	54	23	1.35	0.82–2.24	0.241	A ₁ CTG/any	53	23	1.46	0.85–2.53	0.19
A ₂ GCG	53	5	0.30	0.12–0.76	0.011	A ₂ GCG/any	50	5	0.34	0.13–0.87	0.02
A ₁ GTG	24	3	0.40	0.12–1.33	0.134	A ₁ GTG/any	24	3	0.42	0.12–1.44	0.23
A ₁ GCA	16	0	—	—	0.998	A ₁ GCA/any	16	0	—	—	0.03^e
A ₂ CTG	8	2	0.79	0.17–3.76	0.771	A ₂ CTG/any	8	2	0.84	0.18–4.05	1.00
A ₂ GCA	3	0	—	—	0.999	A ₂ GCA/any	3	0	—	—	1.00

Significant P-values are in bold.

^aLoci: TP53 Ins11951_11966 (rs17878362:A₁>A₂, Allele A₂ carries the 16 bp insertion within the intron 3), Ex4+119G>C (rs1042522:G>C), IVS7+72C>T (rs12947788), Ex11-363G>A (rs17884306:G>A).

^bn is the number of alleles. Because each individual has two alleles, the total number of alleles will be twice the total number of individuals. Individuals with missing genotyping data were not included in the analyses.

^cGlobal P-value for haplotype effect calculated from χ^2 test: P = 0.073.

^dDue to a small number of homozygotes, ORs and 95% CIs are presented only for the dominant model.

^eP-value for diplotype effect was calculated by using the exact test.

Discussion

Pancreatic cancer typically has poor prognosis and very high mortality. The aetiology and molecular pathogenesis of this cancer are still not clearly understood. The development of pancreatic cancer appears as a multifactorial process with a recognized role of alterations in the cascade of genes regulating cellular proliferation control and apoptosis. The aim of the present study was to determine the role of common variants and relative haplotypes in the TP53 gene in relation to pancreatic cancer susceptibility in the Czech population.

The genotype analysis showed that the carriers of heterozygous genotype (in the dominant model) and the carriers of C allele (in the codominant model) for rs1042522:G>C were associated with an increased risk of pancreatic cancer. The putative functional effects of several polymorphisms in the TP53 gene may influence cancer susceptibility. The majority of studies have investigated the TP53 rs1042522:G>C because of its functional relevance due to a weaker *in vitro* affinity of the protein with the common G allele for several transcription-activating factors (19). Apparently, the TP53 Arg72 form (related to the G allele) induces apoptosis more efficiently than the Pro72 form (20). The functional significance of the 16 bp ins/del in intron 3 of the rs17878362:A₁>A₂ polymorphism remains unclear. The intronic sequences in TP53 have been implicated in the regulation of gene expression and in DNA–protein interactions (19,21). Insufficient information is available for TP53 polymorphisms in intron 7 and exon 11 (10,22,23). Results from previous studies based on association between the most investigated TP53 polymorphisms and the risk of cancer have been mainly inconsistent (8). Several studies have reported an association between the 72Pro allele and an increased risk for various cancers, including those in thyroid (24), nasopharyngeal (25,26) and urogenital region (26,27). However, the associations of this polymorphism with cancer are often conflicting since the carriers of the TP53 Arg72 allele have also been found at an increased risk for gastric (28), oesophagus (29) and bladder cancer (30). These discrepancies may arise either from the design of the study or from the differences in allele frequencies between ethnic groups, staging of the malignancy and sample size. However, to the best of our knowledge, this is the first association study exploring the role of TP53 common variants and pancreatic cancer risk.

Interestingly, we found that haplotypes based on the four TP53 polymorphisms (loci in the order: rs17878362:A₁>A₂, rs1042522:G>C, rs12947788:C>T, rs17884306:G>A) showed a moderate differential distribution between cases and controls. In particular, one of the most frequent haplotypes (A₂CCG) was more common in cases than controls. The A₂CCG haplotype when compared with the most common haplotype A₁GCG was associated with a statistically significant increased risk of pancreatic cancer. This outcome appears logical if

considering the results observed in the genotype analysis for the individual rs1042522:G>C polymorphism. Another less frequent haplotype, A₂GCG, was associated with a decreased risk. However, a similar plausible explanation for the less frequent protective haplotypes is precluded by the relatively low numbers of observations. However, the above reported haplotype associations were confirmed also by diplotype analysis.

The analysis of haplotypes represents a much more powerful approach than only analysing individual polymorphisms. Assignment of alleles to chromosomes/haplotypes provides important information on recombination (physical exchange of DNA during meiosis), vital for locating disease-causing mutations by linkage methods. Interestingly, a similar significantly different distribution of the TP53 haplotypes found in the present study was also observed in a previous association study investigating the role of the same variants on the CRC risk, in a population of cases and controls from the Czech Republic (10). The same TP53 haplotypes modulated significantly both colon and rectal cancer risk, suggesting a general mechanism in the genesis of these cancers. It is possible that the haplotypes within the TP53 gene along with SNPs in other genes in the p53 pathway may impact the development not only for pancreatic cancer and CRC but also other cancers and in particular those involved in the gastrointestinal tract.

In the current study, we managed not only to explore the susceptibility to pancreatic cancer in relation to variation of the TP53 gene but also to verify our previous results in a different and larger population of controls. From the haplotype analyses, we observed that some of the outcomes are fairly similar in both studies, either considering the whole population of controls or restricting the analyses to the frequency-matched controls. These results support what we have previously reported, limiting the risk of by-chance findings.

The selection of tagging SNPs was carried out by the help of an extended tag-SNP analysis on the most relevant part of the gene, i.e. from exon 2 to 3'-untranslated region, where almost all the somatic and germline mutations are encountered. In this process, the genetic variability in the first haplotype block was not captured. Following our approach, we captured the most common Caucasian haplotypes, with R² > 0.7 and minor allele frequency > 0.03 and the tagging of TP53 was done with the higher resolution than the majority of previously published studies. With the exception of few recent studies where a large number of variants were analysed (31–33), typically, most of the studies on genetic variation in TP53 are based on the rs1042522:G>C and the haplotypes constructed are based on only two or three polymorphisms (34–38).

As previously observed for the CRC study, the different distribution of the TP53 haplotypes also in the pancreatic cancer cases and controls may be due to a linkage of the disease to unknown functional polymorphism within TP53 or in some neighbouring genes that could

carry putative functional variant(s) linked to the detected haplotypes. This argument is supported by predictions of such associations and the existence of large haplotype blocks within the human genome (39). Moreover, the followed haplotypes represent the entire haplotype block covering the DNA-binding domain of the *TP53* gene, as polymorphisms selected in the study were based on a tagging approach. The observed different modulating effect of the *TP53* polymorphisms within the analysed haplotypes probably also indicates that additional polymorphism(s) may cause differential cancer risk, either directly or through interaction with environmental effects.

Pancreatic cancer belongs to the least studied cancers, mainly due to the difficulties with the recruitment of patients who are quite often in very poor performance status and have rather short overall survival. Indeed, the relatively small size of the analysed cases with pancreatic cancer represents one of the main limitations of the present study. However, apart from few American investigations (40–42), where authors often had to deal with the inclusion of different ethnicities, so far association studies on pancreatic cancer risk and individual susceptibility are all based on limited cohorts of samples.

In conclusion, in our study conducted on a Czech population of Caucasian origin, we report for the first time that haplotypes based on four polymorphisms within the *TP53* gene accounted for population-based differences in pancreatic risk. Interestingly, one of the most frequent haplotypes, which was associated with an increased pancreatic cancer risk, was also found to modulate CRC susceptibility (10). The severity of pancreatic cancer and the difficulty to perform large sample size studies represent a challenge for a combined epidemiological and biological approach in understanding the inherited individual susceptibility to this cancer.

Funding

Grant Agency of the Czech Republic (GACR 305/09/P194); Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health (IGA 8563-5/2005, IGA 9422-3/2007).

Acknowledgements

Authors would like to thank Thomas O'Hearn II for his excellent technical support.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Jemal, A. et al. (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J. Clin.*, **58**, 71–96.
- Parkin, D.M. et al. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.*, **55**, 74–108.
- Gondos, A. et al. (2008) Recent trends in cancer survival across Europe between 2000 and 2004: a model-based period analysis from 12 cancer registries. *Eur. J. Cancer*, **44**, 1463–1475.
- Milne, R.L. et al. (2009) The inherited genetic component of sporadic pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatol.*, **9**, 206–214.
- Del Chiaro, M. et al. (2007) Cancer risk among the relatives of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatol.*, **7**, 459–469.
- Klein, A.P. et al. (2002) Evidence for a major gene influencing risk of pancreatic cancer. *Genet. Epidemiol.*, **23**, 133–149.
- McWilliams, R.R. et al. (2005) Risk of malignancy in first-degree relatives of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer*, **104**, 388–394.
- Whibley, C. et al. (2009) p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 95–107.
- Petitjean, A. et al. (2007) TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*, **26**, 2157–2165.
- Polakova, V. et al. (2009) Genotype and haplotype analysis of cell cycle genes in sporadic colorectal cancer in the Czech Republic. *Hum. Mutat.*, **30**, 661–668.
- Vrana, D. et al. (2009) The association between glutathione S-transferase gene polymorphisms and pancreatic cancer in a central European Slavonic population. *Mutat. Res.*, **680**, 78–81.
- Mohelnikova-Duchonova, B. et al. (2009) CYP2A13, ADH1B, and ADH1C gene polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas*. [Epub ahead of print].

- Greer, J.B. et al. (2009) Hereditary pancreatic cancer: a clinical perspective. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **23**, 159–170.
- Pardini, B. et al. (2009) NBN 657del5 heterozygous mutations and colorectal cancer risk in the Czech Republic. *Mutat. Res.*, **666**, 64–67.
- Barrett, J.C. et al. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, **21**, 263–265.
- Stephens, M. et al. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 978–989.
- Stephens, M. et al. (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am. J. Hum. Genet.*, **73**, 1162–1169.
- Gaunt, T.R. et al. (2007) Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'CubeX'. *BMC Bioinformatics*, **8**, 428.
- Pietsch, E.C. et al. (2006) Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene*, **25**, 1602–1611.
- Pim, D. et al. (2004) p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int. J. Cancer*, **108**, 196–199.
- Gemignani, F. et al. (2004) A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene*, **23**, 1954–1956.
- Berggren, P. et al. (2000) p53 intron 7 polymorphisms in urinary bladder cancer patients and controls. Stockholm Bladder Cancer Group. *Mutagenesis*, **15**, 57–60.
- Berggren, P. et al. (2001) Ethnic variation in genotype frequencies of a p53 intron 7 polymorphism. *Mutagenesis*, **16**, 475–478.
- Granja, F. et al. (2004) Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett.*, **210**, 151–157.
- Tiwawech, D. et al. (2003) The p53 codon 72 polymorphism in Thai nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.*, **198**, 69–75.
- Kuroda, Y. et al. (2003) p53 codon 72 polymorphism and urothelial cancer risk. *Cancer Lett.*, **189**, 77–83.
- Chen, Y.C. et al. (2004) Polymorphisms in GSTT1 and p53 and urinary transitional cell carcinoma in south-western Taiwan: a preliminary study. *Biomarkers*, **9**, 386–394.
- Shen, H. et al. (2004) P53 codon 72 polymorphism and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Oncol. Rep.*, **11**, 1115–1120.
- Kawaguchi, H. et al. (2000) p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. *Cancer Res.*, **60**, 2753–2755.
- Soulitzis, N. et al. (2002) p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett.*, **179**, 175–183.
- Jung, H.Y. et al. (2008) Association study of TP53 polymorphisms with lung cancer in a Korean population. *J. Hum. Genet.*, **53**, 508–514.
- Koshiol, J. et al. (2009) Common genetic variation in TP53 and risk of human papillomavirus persistence and progression to CIN3/cancer revisited. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **18**, 1631–1637.
- Pangilinan, F. et al. (2008) Construction of a high resolution linkage disequilibrium map to evaluate common genetic variation in TP53 and neural tube defect risk in an Irish population. *Am. J. Med. Genet. A*, **146A**, 2617–2625.
- Buyru, N. et al. (2007) p53 genotypes and haplotypes associated with risk of breast cancer. *Cancer Detect. Prev.*, **31**, 207–213.
- Wu, X. et al. (2002) p53 genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. *J. Natl Cancer Inst.*, **94**, 681–690.
- Mitra, S. et al. (2005) Risk assessment of p53 genotypes and haplotypes in tobacco-associated leukoplakia and oral cancer patients from eastern India. *Int. J. Cancer*, **117**, 786–793.
- Khrunin, A.V. et al. (2005) p53 polymorphisms in Russia and Belarus: correlation of the 2-1-1 haplotype frequency with longitude. *Mol. Genet. Genomics*, **272**, 666–672.
- Tan, X.L. et al. (2007) Genetic polymorphisms in TP53, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of colorectal cancer: evidence for gene-environment interaction? *Pharmacogenet. Genomics*, **17**, 639–645.
- Crawford, D.C. et al. (2005) Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu. Rev. Med.*, **56**, 303–320.
- Jiao, L. et al. (2007) Haplotype of N-acetyltransferase 1 and 2 and risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **16**, 2379–2386.
- Duell, E.J. et al. (2008) Detecting pathway-based gene-gene and gene-environment interactions in pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **17**, 1470–1479.
- McWilliams, R.R. et al. (2009) Polymorphic variants in hereditary pancreatic cancer genes are not associated with pancreatic cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **18**, 2549–2552.

Received October 14, 2009; revised December 11, 2009; accepted January 24, 2010

CYP2A13, ADH1B, and ADH1C Gene Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk

Beatrice Mohelnikova-Duchonova, MD,*† David Vrana, MD,*‡ Ivana Holcatova, MD, PhD,§
Miroslav Ryska, MD, PhD,|| Zdenek Smerhovsky, MD, PhD,¶ and Pavel Soucek, PhD*

Objectives: Pancreatic carcinoma etiology and molecular pathogenesis are weakly understood. Based on the assumption that genetic variation in carcinogen metabolism further modifies the risk of exposure-related cancers, we studied the association of polymorphisms in the tobacco carcinogen-metabolizing gene CYP2A13 (Arg101Stop) and the alcohol-metabolizing genes ADH1B (Arg48His) and ADH1C (Ile350Val) with pancreatic cancer risk.

Methods: Polymorphisms were studied by allelic discrimination.

Results: In a hospital-based case-control study, CYP2A13 variant alleles coding an inactive enzyme were found in 7 of 265 cancer-free controls and in none of 235 pancreatic carcinoma patients. Neither ADH1B or ADH1C polymorphisms alone nor their combinations showed a significant effect on pancreatic cancer risk.

Conclusions: The first study of the roles of CYP2A13, ADH1B, and ADH1C in pancreatic cancer etiology suggested that the controls may have a lower ability to bioactivate tobacco-derived procarcinogens than the cases.

Key Words: pancreas, cancer, polymorphism, CYP2A13, ADH1

(*Pancreas* 2010;39: 144–148)

Pancreatic carcinoma (*International Statistical Classification of Diseases, 10th Revision; C25; OMIM, 260350*) is the fourth leading cause of cancer-related deaths in the Czech Republic, with only a minimum number of patients surviving in 5 years.^{1,2} Contrary to the poor prognosis associated with this disease, its etiology and molecular pathogenesis are still weakly understood.

Tobacco smoke has been evaluated as a potential risk factor for pancreatic cancer, and a number of studies have also suggested that ethanol, together with elements of cigarette smoke, may act as a cocarcinogen and enhance tumor formation.^{3–5} It is assumed that genetic variation in carcinogen metabolism further modifies the risk of exposure-related cancer.⁶

Tobacco carcinogens such as 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) are metabolized in the human body by cytochromes P450 (P450, EC 1.14.14.1). NNK induces lung tumors in all laboratory animals tested and nasal cavity tumors, pancreatic cancer, and liver tumors in rats.^{7,8} P450 2A13

was suggested as the most active enzyme in metabolic activation of NNK.⁹ The nonsense polymorphism, CYP2A13*1/*7 (rs72552266 and Arg101Stop), may be an important modifier of tobacco-associated cancer risk because the truncated protein lacks enzymatic activity.¹⁰

Ethanol metabolism in pancreatic acinar cells is mediated by both the oxidative and the nonoxidative pathways.^{11–13} The oxidative pathway is particularly catalyzed by alcohol dehydrogenases (ADH, EC 1.1.1.1), aldehyde dehydrogenases (ALDH, EC 1.2.1.5), and less by P450 2E1.¹⁴ Previous case-control studies proved the association between the ADH1B*1 allele and an increased risk of esophageal cancer,^{15,16} and squamous cell carcinoma of the head and neck.¹⁷ Slow metabolizers (because of ADH1B*1) had also significantly increased the risk of colorectal cancer in a Japanese population (odds ratio [OR], 1.32; 95% confidence interval [CI], 1.07–1.63). Carriage of the ADH1C*2/*2 genotype increased the risk of oral squamous cell carcinoma in heavy (OR, 2.65; 95% CI, 1.08–2.14) and moderate (OR, 1.6; 95% CI, 1.15–2.03) drinkers.¹⁸

The goal of this study was to explore whether polymorphisms in the genes of the principal tobacco- and ethanol-metabolizing enzymes CYP2A13 (OMIM, 608055), ADH1B (OMIM, 103720), and ADH1C (OMIM, 103730) modify susceptibility to pancreatic cancer. These associations were not studied in pancreatic cancer etiology so far.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Both the cases and the cancer-free controls were of white Czech origin recruited in the period between September 2004 and February 2008. A total of 630 participants were recruited during the study period. All cases were incident pancreatic cancer patients attending 5 oncology and surgery departments in Prague and 1 in Pribram (central Bohemia). Pancreatic cancer diagnosis in patients was periodically reconfirmed. Thirty-eight patients were excluded because of a diagnosis other than pancreatic cancer (15, pancreatitis and 23, other diagnoses) found during follow-up. As a result, 142 patients with a histologically verified diagnosis and 118 patients with a clinically verified diagnosis were included into the study. Twenty-five of the verified cases were excluded because variables needed for the analysis (such as age) were not available to investigators. Clinical-pathological data on patients were collected from their medical records (date of diagnosis, stage, grade, and histologic diagnosis were available). The randomly selected controls were 332 healthy individuals from the same catchment areas as the cases and consisted of 2 independent groups: cancer-free subjects recruited during the 3 months after the recruitment of the cases by general practitioners in Prague (179 controls) and blood donors from 2 centers in Prague and Pribram (153 controls). The controls were included into the study under the condition that the difference in their age was not larger than 5 years from cases recruited in the same period. No other selection

From the *Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health; †First Faculty of Medicine, Charles University in Prague; ‡Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General Teaching Hospital; §Institute of Hygiene and Epidemiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague; ||Department of Surgery, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Central Military Hospital; and ¶Institute of Epidemiology, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

Received for publication March 2, 2009; accepted August 4, 2009.

Reprints: Pavel Soucek, PhD, Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, Prague 10, 100 42 Czech Republic (e-mail: psoucek@szu.cz).

This work was supported by the Internal grant agency of the Ministry of Health, Czech Republic (grants Nos. 8563-5 and 9422-3).

Copyright © 2010 by Lippincott Williams & Wilkins

criteria were applied to the recruitment of the controls. Basic epidemiological data on all participants were collected from a face-to-face questionnaire survey (personal and family history, short occupational history, smoking and drinking history, history of physical activity, reproductive history, and nutritional information). Sixty-seven controls were excluded because variables needed for the analysis were missing. Blood samples of 235 cases and 265 controls were available in sufficient quality for genotyping. All participants were informed and gave their written consent to participate in the study. The design of the study was approved by the ethical committee of the First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic.

DNA Isolation and Genotyping

Blood was collected during diagnostic procedures using tubes with a K₃EDTA anticoagulant. Genomic DNA was extracted from peripheral lymphocytes using a BioSprint 15 DNA Blood kit (Qiagen, Valencia, Calif) by KingFisher mL automated system (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) according to the procedure supplied by the manufacturer. Polymorphisms in CYP2A13 (*1/*7, Arg101STOP), ADH1B (Arg48His, rs1229984), and ADH1C (Ile350Val, rs698) were determined by TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (assay ID Nos. C_30634006_10, C_2688467_20, and C_26457410_10, respectively) obtained from Applied Biosystems (Foster City, Calif). Reaction mixtures for real-time polymerase chain reaction (PCR) contained 5 μ L of 2 \times TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) for CYP2A13 and ADH1C or 5 μ L AB Solute QPCR ROX Mix (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Ill) for ADH1B, 0.25 μ L of TaqMan drug metabolism genotyping assays, and 4.75 μ L of DNA template diluted to a concentration of 0.7 ng/ μ L. Cycling parameters for CYP2A13 and ADH1C were initial denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 55 cycles consisting of denaturation at 92°C for 15 seconds and annealing at 58°C for 90 seconds. The following cycling conditions were used for ADH1B: initial denaturation at 95°C for 15 minutes, followed by 50 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing at 62°C for 60 seconds. The nontemplate control consisted of a reaction tube in which water was used in place of DNA sample. Real-time PCR was performed using the RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Ten percent of the randomly selected samples were reanalyzed with 100% concordance of the results.

Statistical Analysis

In the first round of analyses, the Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for the control group. The distribution of genotypes did not significantly deviate from the equilibrium. Then, we used the binary logistic regression to estimate the ORs, the 95% CI for the OR, and the corresponding *P* values of the different genotype frequencies among the pancreatic cancer and the control groups, adjusting for the age at recruitment, sex, weight, diabetes, pancreatitis, smoking, alcohol drinking, and coffee and tea consumption. Furthermore, we attempted to test for modifying the effect of smoking and alcohol, coffee, and tea consumptions on the associations of interest. Because we failed to demonstrate interactions between potential modifiers of effect and studied genotypes, this part of the statistical analysis is not reported. A *P* < 0.05 would be considered significant. Analyses were performed using the Win SPSS v13.0 (SPSS, Chicago, Ill).

RESULTS

Characteristics of the Studied Population

Complete characteristics of the studied population are presented in Table 1. Our analyses confirmed high age at re-

TABLE 1. Characteristics of the Studied Population

	Controls	Cases
Sex, n		
Male	158	148
Female	107	87
Total	265	235
Age at recruitment, yr		
Mean \pm SD	57.9 \pm 10.6	61.9 \pm 10.5
Total	265	235
Weight, kg		
Mean \pm SD	76.0 \pm 14.5	67.5 \pm 15.0
Total	262	235
Personal history of diabetes, n		
Negative	245	194
Positive	17	33
Total	262	227
Personal history of pancreatitis, n		
Negative	258	212
Positive	4	15
Total	262	227
Smoking, n		
Never smoker	104	71
Former smoker (>10 yr)	53	34
Former smoker (0–10 yr)	22	25
Current smoker	75	57
Total	254	187
Alcohol, n		
Teetotaler	77	68
Former drinker	39	51
Regular drinker	140	68
Total	256	187
Coffee, n		
Never (or <1/mo)	34	73
<1/wk	4	7
1–2/wk	26	14
3–5/wk	14	18
1–2/d	135	85
3–4/d	43	22
>4/d	6	9
Total	262	228
Tea, n		
Never (or <1/mo)	68	99
<1/wk	15	14
1–2/wk	32	28
3–5/wk	36	27
1–2/d	70	52
3–4/d	32	7
>4/d	9	1
Total	262	228

cruitment (OR, 1.03; 95% CI, 1.00–1.05; *P* = 0.016), male sex (OR, 2.70; 95% CI, 1.65–4.43; *P* < 0.001), low weight (OR, 1.06; 95% CI, 1.04–1.08; *P* < 0.001), and positive personal history of pancreatitis (OR, 9.93; 95% CI, 2.63–37.52; *P* = 0.001) or diabetes (OR, 4.09; 95% CI, 1.95–8.55; *P* < 0.001) as pancreatic cancer risk predictors. Tea drinkers (more than 3 teacups per day) had significantly reduced pancreatic cancer

risk than others (less than 3 teacups per day; OR, 0.16; 95% CI, 0.07–0.40; *P* < 0.001). Smoking, alcohol consumption, and coffee drinking played no role as independent risk factor (results not shown).

CYP2A13, ADH1B, ADH1C Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk

In age-, sex-, weight-, diabetes-, pancreatitis-, smoking-, alcohol-, coffee- and tea-adjusted analyses, neither ADH1B or ADH1C polymorphisms alone nor their combinations showed a significant effect on pancreatic cancer risk (Table 2). Both interactions and potential additive effects were followed in statistical analyses. Neither ADH1B nor ADH1C polymorphisms showed significant association with pancreatic cancer risk in drinkers compared with nondrinkers in adjusted analyses (results not shown). CYP2A13 variant allele *7 coding inactive enzyme was found in 7 of the 265 cancer-free controls and in none of the 235 pancreatic carcinoma patients (Table 2). Although the trend seems strong, it could not be confirmed by statistical analysis because of the absence of CYP2A13*7 carriers in the pancreatic cancer case group. In the subgroup analysis, 2 of 104 smokers and 4 of 150 nonsmokers carried the CYP2A13*7 allele among the controls with data available.

DISCUSSION

Pancreatic cancer typically has poor prognosis and very high mortality. The etiology and the molecular pathogenesis of this cancer are still weakly understood. In our study, we con-

firmed a significant effect of most of the previously published pancreatic cancer risk factors (age, sex, weight, and personal history of chronic pancreatitis or diabetes).^{19,20} We have not observed any effect of tobacco smoking, alcohol consumption, and coffee drinking, but individuals who drank more than 3 teacups per day had significantly reduced pancreatic cancer risk than others. This result supports the previous study on Polish pancreatic cancer patients that found a strongly significant trend of decreasing risk with increasing lifetime consumption of tea (*P* < 0.001)²¹ but contradicts to the recent Japanese study reporting null result.²² Discrepancy of results may be due to the differences in tea drinking habits, tea quality, or study design.

Besides alterations of high-penetrance genes, interaction of environmental factors with low-penetrance genes is suspected to contribute to pancreatic cancer onset. Despite the fact that other cancer types were frequently studied regarding gene-environment interactions, pancreatic cancer belongs to the least-studied cancers. Perhaps, because of the difficulties with recruitment of patients who are quite often in very poor performance status and have rather short overall survival, the number of published studies is rather low. We aimed to investigate the contribution of functionally relevant polymorphisms in CYP2A13, ADH1B, and ADH1C to pancreatic cancer susceptibility in the case-control study of a central European population with one of the highest incidences in the Western world. We observed clear prevalence of the variant CYP2A13 allele causing premature stop at codon 101 (knockout allele *7) among the controls in comparison with the pancreatic cancer patients. Because there was no carrier of CYP2A13*7 among the cases, the significance of this association with pancreatic

TABLE 2. Genotype Distribution in the Studied Population

Gene/Genotype	Controls	Cases	OR*	95% CI*	<i>P</i>
CYP2A13					
Arg/Arg	258	235	Reference		
Arg/STOP	7	0	—†		
STOP/STOP	0	0	—†		
Total	265	235			
ADH1B					
Arg/Arg	242	213	Reference		
Arg/His	22	22	1.25	0.56–2.77	0.583
His/His	1	0	—†		
Arg/His + His/His	23	22	1.16	0.53–2.55	0.706
Total	265	235			
ADH1C					
Ile/Ile	80	83	Reference		
Ile/Val	138	109	0.93	0.56–1.53	0.766
Val/Val	46	43	1.65	0.87–3.13	0.123
Ile/Val + Val/Val	184	152	1.09	0.68–1.74	0.730
Total	264	235			
ADH1B + ADH1C I					
Arg/Arg + Ile/Ile	70	71	Reference		
(Arg/His or Arg/Arg) or (Ile/Val or Ile/Ile)	196	164	1.16	0.70–1.90	0.566
ADH1B × ADH1C II					
Arg/Arg + Ile/Ile	70	71	Reference		
(Arg/His or Arg/Arg) and (Ile/Val or Ile/Ile)	11	10	1.09	0.31–3.85	0.888

*Adjusted for age at recruitment, sex, weight, diabetes, pancreatitis, smoking, alcohol drinking, and coffee and tea consumptions.

†Statistics could not be performed because of the absence of individuals in 1 or more of the analyzed groups.

cancer risk could not be statistically evaluated. Nevertheless, bearing in mind the well-proven pivotal role of P450 2A13 in bioactivation of tobacco smoke-borne xenobiotics⁹ and the hypothetically lower activity of this enzyme in the control group than in the patients (lacking the knockout allele), our result seems highly relevant. Moreover, the previously published multivariate analysis showed an elevated risk for small cell lung cancer in subjects heterozygous for CYP2A13*7 (OR, 9.9; 95% CI, 1.9–52.2).²³ Several polymorphisms exist in CYP2A13. Although the most frequently studied Cys variant in codon 257 of CYP2A13 (Single Nucleotide Polymorphism database, rs8192789) has been associated with the substantially reduced risk of lung adenocarcinoma in the Chinese population (OR, 0.41; 95% CI, 0.23–0.71),²⁴ it unlikely impacts NNK metabolism *in vivo*.²⁵ However, a protective or additive effect of other CYP2A13 alleles with unknown functional relevance cannot be ruled out.²⁶

Alcohol dehydrogenase and ALDH activities were detected in the human pancreas, and the activity of ADH was much higher than that of ALDH.^{27,28} Moreover, in pancreatic cancer tumors, the activity of ADH1C was significantly higher than that in healthy tissues ($P < 0.001$). By genotyping 9080 white individuals from the general population, the ADH1B slow metabolizers with genotype ADH1B*1/*1 drank more alcohol and had a higher risk of alcoholism than fast alcohol metabolizers (ADH1B*2/*2; rs1229984).²⁹ In addition, the slower ADH activity haplotype (ADH1B*1-ADH1C*2) was associated with a higher risk of being a drinker.³⁰ The relation between ADH activity and alcohol exposure is thus well documented, and the presence of high levels of ADHs in pancreatic cancer tissues makes these enzymes an attractive target for the study of pancreatic cancer etiology. The role of alcohol in pancreatic cancer etiology is controversial.^{31,32} Genkinger et al³³ conducted a pooled analysis of the primary data from 14 prospective cohort studies. The study sample consisted of 862,664 individuals, among whom 2187 incident pancreatic cancer cases were identified. Their findings are consistent with a modest increase in the risk of pancreatic cancer (RR, 1.22; 95% CI, 1.03–1.45) with a consumption of 30 or more grams of alcohol per day.³³

However, in our study, ADH1B or ADH1C polymorphisms alone nor their combinations showed a significant effect on pancreatic cancer risk in risk factor-adjusted analyses. Drinking status did not play a significant role in the stratified analyses as well.

To our knowledge, we present the first study evaluating the role of CYP2A13, ADH1B, and ADH1C polymorphisms in pancreatic cancer in a white population. The observed prevalence of the CYP2A13*7 knockout allele among pancreatic cancer patients requires replicate studies in related populations of white origin.

REFERENCES

1. Cancer Incidence 2005 in the Czech Republic IHIS CR, NOR CR, Czech Republic. 2008;62.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58:71–96.
3. Zhang L, Weddle DL, Thomas PE, et al. Low levels of expression of cytochromes P-450 in normal and cancerous fetal pancreatic tissues of hamsters treated with NNK and/or ethanol. *Toxicol Sci*. 2000;56:313–323.
4. Silverman DT, Brown LM, Hoover RN, et al. Alcohol and pancreatic cancer in blacks and whites in the United States. *Cancer Res*. 1995;55:4899–4905.
5. Malats N, Porta M, Corominas JM, et al. Ki-ras mutations in exocrine pancreatic cancer: association with clinico-pathological characteristics and with tobacco and alcohol consumption. PANK-ras I Project Investigators. *Int J Cancer*. 1997;70:661–667.
6. Suzuki H, Morris JS, Li Y, et al. Interaction of the cytochrome P4501A2, SULT1A1 and NAT gene polymorphisms with smoking and dietary mutagen intake in modification of the risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2008;29:1184–1191.
7. Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol*. 1998;11:559–603.
8. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:1194–1210.
9. Su T, Bao Z, Zhang QY, et al. Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res*. 2000;60:5074–5079.
10. Zhang X, Chen Y, Liu Y, et al. Single nucleotide polymorphisms of the human cyp2a13 gene: evidence for a null allele. *Drug Metab Dispos*. 2003;31:1081–1085.
11. Haber PS, Apte MV, Applegate TL, et al. Metabolism of ethanol by rat pancreatic acinar cells. *J Lab Clin Med*. 1998;132:294–302.
12. Haber PS, Apte MV, Moran C, et al. Nonoxidative metabolism of ethanol by rat pancreatic acini. *Pancreatol*. 2004;4:82–89.
13. Gukovskaya AS, Mouria M, Gukovsky I, et al. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. *Gastroenterology*. 2002;122:106–118.
14. Vonlaufen A, Wilson JS, Pirola RC, et al. Role of alcohol metabolism in chronic pancreatitis. *Alcohol Res Health*. 2007;30:48–54.
15. Yang SJ, Wang HY, Li XQ, et al. Genetic polymorphisms of ADH2 and ALDH2 association with esophageal cancer risk in southwest China. *World J Gastroenterol*. 2007;13:5760–5764.
16. Lee CH, Lee JM, Wu DC, et al. Carcinogenic impact of ADH1B and ALDH2 genes on squamous cell carcinoma risk of the esophagus with regard to the consumption of alcohol, tobacco and betel quid. *Int J Cancer*. 2008;122:1347–1356.
17. Hiraki A, Matsuo K, Wakai K, et al. Gene-gene and gene-environment interactions between alcohol drinking habit and polymorphisms in alcohol-metabolizing enzyme genes and the risk of head and neck cancer in Japan. *Cancer Sci*. 2007;98:1087–91.
18. Solomon PR, Selvam GS, Shanmugam G. Polymorphism in ADH and MTHFR genes in oral squamous cell carcinoma of Indians. *Oral Dis*. 2008;14:633–639.
19. Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A metaanalysis. *JAMA*. 1995;273:1605–1609.
20. Mukesh V. Pancreatic cancer epidemiology. *Technol Cancer Res Treat*. 2005;4:295–301.
21. Zatonski WA, Boyle P, Przewozniak K, et al. Cigarette smoking, alcohol, tea and coffee consumption and pancreas cancer risk: a case-control study from Opole, Poland. *Int J Cancer*. 1993;53:601–607.
22. Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi A, et al. JACC Study Group, green tea consumption and the risk of pancreatic cancer in Japanese adults. *Pancreas*. 2008;37:25–30.
23. Cauffiez C, Lo-Guidice JM, Quaranta S, et al. Genetic polymorphism of the human cytochrome CYP2A13 in a French population: implication in lung cancer susceptibility. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;30:662–669.
24. Wang H, Tan W, Hao B, et al. Substantial reduction in risk of lung adenocarcinoma associated with genetic polymorphism in CYP2A13, the most active cytochrome P450 for the metabolic activation of tobacco-specific carcinogen NNK. *Cancer Res*. 2003;63:8057–8061.
25. Schlicht KE, Michno N, Smith BD, et al. Functional characterization of CYP2A13 polymorphisms. *Xenobiotica*. 2007;37:1439–1449.
26. Sim SC. CYP2A13 allele nomenclature. Available at: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2a13.htm>. Accessed August 31, 2009.
27. Chrostek L, Jelski W, Szmikowski M, et al. Alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the human pancreas. *Dig Dis Sci*. 2003;48:1230–1233.

28. Jelski W, Chrostek L, Szmitkowski M. The activity of class I, II, III, and IV of alcohol dehydrogenase isoenzymes and aldehyde dehydrogenase in pancreatic cancer. *Pancreas*. 2007;35:142–146.
29. Tolstrup JS, Nordestgaard BG, Rasmussen S, et al. Alcoholism and alcohol drinking habits predicted from alcohol dehydrogenase genes. *Pharmacogenomics J*. 2008;8:220–227.
30. Matsuo K, Hiraki A, Hirose K, et al. Impact of the alcohol-dehydrogenase (ADH)1C and ADH1B polymorphisms on drinking behavior in nonalcoholic Japanese. *Hum Mutat*. 2007;28:506–510.
31. Jiao L, Silverman DT, Schairer C, et al. Alcohol use and risk of pancreatic cancer: the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am J Epidemiol*. 2009;169:1043–1051.
32. Rohrmann S, Linseisen J, Vrieling A, et al. Ethanol intake and the risk of pancreatic cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control*. 2009;20:785–794.
33. Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, et al. Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18:765–776.

ÚLOHA EXPRESE GENŮ CHINONOXIDOREDUKTÁZY 1 A 2 V ROZVOJI KARCINOMU PRSU

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

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

¹ STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, PRAHA

² 3.LF UK, PRAHA

³ RADIOTERAPEUTICKO-ONKOLOGICKÉ ODDĚLENÍ, FN MOTOL, PRAHA

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

⁵ ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFN A 1.LF UK, PRAHA

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

Souhrn

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

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

Summary

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

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

Úvod

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

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

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

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

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

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

Pacientky a metody

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

Tabulka 1: Klinické a histopatologické charakteristiky sledovaných pacientek.

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

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

† mucinózní a malobuněčný karcinom

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

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

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

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

§ počet sledovaných vzorků

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

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

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

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

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

Výsledky

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

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

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

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

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

§ počet sledovaných vzorků

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

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

Diskuze

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

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

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

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

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

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

Závěr

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

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

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

Literatura

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

Korespondenční adresa:

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

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

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

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