

Strokovni prispevek/Professional article

VPLIV POLIMORFIZMA GLUTATIONSKIH S TRANSFERAZ NA POJAV SEKUNDARNIH NOVOTVORB PO ZDRAVLJENJU LEVKEMIJE V OTROŠTVU

THE EFFECT OF POLYMORPHISM IN GLUTATHIONE S-TRANSFERASES ON THE DEVELOPING SECOND MALIGNANT NEOPLASMS AFTER LEUKEMIA TREATMENT IN CHILDHOOD

Janez Jazbec¹, Vita Dolžan², Maruša Debeljak¹, Richard Aplenc³, Berta Jereb⁴

¹ Služba za onkologijo in hematologijo, Pediatrična klinika, Klinični Center, Vrazov trg 1, 1525 Ljubljana

² Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

³ Children's Hospital of Philadelphia, 34th Street, Philadelphia, USA

⁴ Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana

Prispelo 2004-02-13, sprejeto 2004-03-12; ZDRAV VESTN 2004; 73: Supl. I: 19-22

Ključne besede: glutation S transferaze; levkemija otroške dobe; sekundarna novotvorba

Izveček – Izhodišča. Povečano tveganje za nastanek sekundarnih novotvorb po zdravljenju levkemije v otroštvu je delno povezano tudi s specifičnimi elementi zdravljenja, kot so alkilirajoči agensi, inhibitorji topoizomeraz in radioterapija. Genski polimorfizem encimov, ki so vpleteni v metabolizem zdravil, lahko vpliva na detoksifikacijo kemoterapevtikov in prek tega mehanizma povečuje nevarnost za nastanek sekundarnih novotvorb.

Metode. Za preveritev hipoteze, da je polimorfizem genov glutationskih S transferaz (GST) povezan z zvečanim tveganjem za nastanek sekundarnih novotvorb, smo primerjali genotipe GSTT1, GSTM1 in GSTP1 16 bolnikov, pri katerih je bila po zdravljenju akutne levkemije v otroštvu odkrita sekundarna novotvorba, z genotipi pri kontrolni skupini.

Rezultati. Genotip GSTM1 null smo našli pri 44% bolnikov s sekundarno novotvorbo in pri 50% kontrol ($p = 0,76$), genotip GSTT1 null pri 19% primerov in 29% kontrol ($p = 0,73$) in GSTP1_{105 Ile/11e} v 50% primerov in 37% kontrol ($p = 0,53$).

Zaključki. Razlike v distribuciji GST genotipov pri bolnikih s sekundarnimi novotvorbami po zdravljenju akutne levkemije v otroštvu so v primerjavi s kontrolno skupino statistično neznačilne.

Key words: glutathione S-transferase; childhood leukemia; secondary neoplasm

Abstract – Background. Survivors of childhood leukemia have an increased risk of developing second malignant neoplasms and specific treatment factors such as alkylating agents, topoisomerase inhibitors and radiation have been associated with their occurrence. Genetic polymorphism in drug-metabolizing enzymes may result in impaired detoxification of chemotherapeutics and may lead to increased risk for cancer.

Methods. To test if polymorphism in glutathione S-transferases (GST) genes is associated with occurrence of secondary malignant neoplasms, we compared GSTM1, GSTT1 and GSTP1 genotypes among 16 patients treated for childhood leukemia in whom second neoplasm occurred and matched the control group.

Results. GSTM1 null genotype was found in 44% of patients with second neoplasms and in 50% in control group ($p = 0.768$), GSTT1 null genotype in 19% of cases and in 29% of controls ($p = 0.729$) and GSTP1_{105 Ile/11e} in 50% of cases and 37% of controls ($p = 0.537$). Differences in distribution of GST genotypes in patients with second neoplasms after childhood leukemia, compared to a matched control group of patients were not statistically significant.

Conclusions. In our study we were not able to show relation between GST genotype and occurrence of second neoplasms after the childhood acute leukemia.

Uvod

Ob večji uspešnosti zdravljenja vseh oblik otroškega raka v zadnjih desetletjih, se vse več pozornosti usmerja na preučevanje poznih posledic, ki se pri bolnikih pojavljajo še desetletja po zaključenem zdravljenju. Pojav sekundarnih novotvorb je opisan po zdravljenju različnih vrst otroških tumorjev. Možni vzročni dejavniki pa so tudi nekateri elementi zdravljenja primarne bolezni, kot na primer alkilirajoči agensi, inhibitorji topozomeraz in radioterapija (1). Znano je, da je posledica genetske variabilnosti v aktivnosti encimov, vpletenih v presnovo zdravil, lahko pomembna interindividualna razlika v presnovi citostatikov, zaradi česar lahko pride pri posameznih bolnikih, izpostavljenih enakim odmerkom zdravila, do različnih hudo izraženih stranskih učinkov (2). Posledica polimorfizma encimov, udeleženih v presnovi citostatikov, je lahko spremenjena detoksifikacija citostatika. Višje ravni genotoksične substance prispevajo k dodatni okvari DNK, kar lahko vodi v razvoj sekundarne neoplazme.

Glutation S transferaze (GST) so družina encimov, ki so udeleženi v detoksifikaciji genotoksičnih elektrofilnih snovi. Katalizirajo njihovo konjugacijo z glutationom. Doslej je opisan polimorfizem petih humanih GST genov: mu (GSTM), theta (GSTT), pi (GSTP), alfa, sigma in zeta. Polimorfnost teh encimov je funkcionalno pomembna (3). Polimorfizem GSTT1 in GSTM1 je posledica delecije, pri čemer bolnik, ki je homozigot, nima aktivne oblike encima. Homozigotna delecija GSTM1 je ugotovljena pri 50%, GSTT1 pa pri 20% posameznikov belske rase (4). Polimorfizem GSTP1 je posledica substitucije Izolevcina in Valina na kodonu 105 (GSTP*1B), posledica je sprememba v katalitski aktivnosti in termični stabilnosti. Alela GSTM1 in GSTT1 sta povezana s povečanim tveganjem za nastanek različnih solidnih tumorjev in levkemije (5-8), prisotnost gena GSTP*1B pa je bila povezana z nastankom skemoterapijo inducirane levkemije (9). Po drugi strani je bilo ugotovljeno, da je pri tumorjih z visoko ekspresijo GSTP1 občutljivost na kemoterapevtike povečana (10) in da je lahko prisotnost polimorfne alela zaščitni dejavnik pred citotoksičnim učinkom elektrofilnih citostatikov (11). Tveganje za raka pri posamezniku s homozigotno delecijo GSTT1 ali GSTM1 je zaradi tega majhno, pač pa se tveganje bistveno poveča ob interakciji z drugimi karcinogenimi dejavniki (npr. kajenje). Presnova nekaterih citostatikov, ki so integralni del zdravljenja otroških levkemij, kot so na primer epipodofilotoksini, antracilini, alkilirajoči agensi, poteka preko GST (12). Razlika v njihovi presnovi bi lahko bila dejavnik tveganja za razvoj sekundarnih novotvorb.

V naši študiji smo želeli preučiti vpliv polimorfizma GST na tveganje za razvoj sekundarne novotvorbe po zdravljenju levkemije v otroštvu. Primerjali smo delež GSTT1, GSTM1 in GST*1B genotipov pri bolnikih, zdravljenih zaradi levkemije v otroštvu, pri katerih je po končanem zdravljenju bila ugotovljena sekundarna neoplazma, z deležem v kontrolni skupini, ki so jo sestavljali bolniki, zdravljeni zaradi levkemije v otroštvu, pri katerih v času opazovanja po zdravljenju nismo ugotovili nastanka sekundarne novotvorbe.

Bolniki in metode

V obdobju od 1. 1. 1961 do 12. 10. 2000 je registriranih v Registru raka Slovenije 449 bolnikov, ki so se zdravili zaradi akutne levkemije in so bili ob diagnozi mlajši od 16 let. Med njimi je bila pri 16 bolnikih po zdravljenju levkemije ugotovljena druga novotvorba. Bolnike s sekundarno novotvorbo smo primerjali s skupino bolnikov z enako osnovno diagnozo, vsakemu primeru smo izbrali po dva kontrolna primera, ki sta se ujemala po starosti, spolu, letu diagnoze in trajanju opazovanja po zaključenem zdravljenju. Zdravljenje je obsegalo kombinirano citostatično zdravljenje in radioterapijo v skladu s protokolom, aktualnim v obdobju zdravljenja.

Ekstrakcija DNK

DNK smo ekstrahirali iz arhivskih vzorcev razmazov kostnega mozga. Za ekstrakcijo smo uporabili QIAamp DNA-extraction minikit (Qiagen, Hilden, Germany) v skladu z navodili proizvajalca za delo z arhivskimi razmazi kostnega mozga in modifikacijami, kot so jih opisali Aplenc in sodelavci (13).

Genotipizacija GST

Za ugotavljanje delecije GSTM1 in GSTT1 smo uporabili multipleksno metodo reakcije z verižno polimerazo (PCR). Oba gena smo simultano pomnožili v enostopenjski PCR reakciji skupaj z genom za β -globin, ki je služil kot interna pozitivna kontrola, (14), ker pa je bila ekstrahirana DNK fragmentirana, smo kot oligonukleotidni začetnik uporabili krajše segmente genov GST. Sekvence oligonukleotidnih začetnikov so bile: GSTM1-F: 5'-GAG ATG AAG TCC TTCAGA-3'; GSTM1-R: 5'-GCT TCA CGT GTT ATG GAG GTT-3'; GSTT1-F: 5'-ATG TGA CCC TGC AGT TGC-3'; GSTT1-R: 5'-GAG ATG TGA G(C/G)A CCA GTA AGG AA-3'; BGLO-F: 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC in BGLO-R: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'. Velikost posameznih ampikonov je bila 130 bp (GSTM1), 70 bp (GSTT1) in 268 bp (BGLO).

Ekson 5 je bil pomnožen iz genomske DNK kot so opisali Ali-Osman in sodelavci (15). Oligonukleotidna začetnika exona 5 sta bila: GSTP*B-2F: 5'-GGA CAT GGT GAA TGA CGG-3' in GSTP-2R: 5'-GGT CAG CCC AAG CCA CCT GAG-3' (14). Restrikcija 164 bp dolgega ampikona z *Bsm*AI je povzročila nastanek dveh fragmentov dolžine 126 in 38 bp ob prisotnosti 105Val alela. Genotipizacijo smo po naključnem izboru 10% vzorcev ponovili zaradi kontrole zanesljivosti genotipizacije.

Statistična analiza

Za statistično analizo smo uporabili Fischerjev test. Primerjali smo frekvenco pojavljanja GST genotipov pri bolnikih s sekundarno novotvorbo in v kontrolni skupini. Izračunali smo razmerje pričakovanj (RP) in njihov 95-odstotni interval zaupanja (IZ). P vrednosti smo računali dvosmerno. Genotipe GST in njihove kombinacije smo pri računanju obravnavali kot kategorične spremenljivke. Statistično analizo smo opravili s programskim paketom SPSS verzija 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.)

Rezultati

Med bolniki s sekundarno neoplazmo in kontrolno skupino ni bilo statistično pomembne razlike v starosti, spolu, času opazovanja in starosti ob diagnozi. V obeh skupinah je delež dečkov večji.

Kot je prikazano v razpredelnici 1, je bila najpogostejša sekundarna novotvorba tumor centralnega živčnega sistema (6 primerov), sledijo pa ne-Hodgkinov limfom v treh primerih, Hodgkinov limfom in akutna mieloblastna levkemija v dveh primerih. V enem primeru je šlo za osteosarkom, fibrosarkom in bazocelularni karcinom.

Analizo genotipov GSTM1, GSTT1 and GSTP1_{codon105} smo uspešno opravili pri vseh 48 preiskovancih. Prevalence genotipov so: GSTM1 + 52%, GSTM1 null 48%, GSTT1 + 77%, GSTT1 null 23%, GSTP1 Ile₁₀₅/Ile₁₀₅ 42%, GSTP1 Ile₁₀₅/Val₁₀₅ 45%, GSTP1 Val₁₀₅/Val₁₀₅ 13%. V razpredelnici 2. je prikazana razporeditev genotipov GSTM1, GSTT1, GSTP1_{codon105} pri 16 preiskovancih (bolniki s sekundarno novotvorbo) in 32 kontrolnih bolnikih in njihova povezava s pojavom sekundarne novotvorbe po zdravljenju akutne levkemije v otroštvu. Pri primerjavi bolnikov s sekundarnimi novotvorbami po zdravljenju akutne levkemije v otroštvu s kontrolno skupino nismo našli statistično značilnih razlik v distribuciji genotipov GST.

Razpr. 1. Značilnost 16 bolnikov s sekundarnimi novotvorbami po zdravljenju akutne levkemije v otroštvu z rezultati genotipizacije GST.

Table 1. Characteristics and results of GST genotyping of 16 patients with secondary neoplasms after treatment of acute leukemia in childhood.

Bolnik	Starost ob diagnozi levkemije	Čas do druge novotvorbe	Druge novotvorbe	GSTM1 (- = null genotip)	GSTT1 (- = null genotip)	GSTP1
Patient N°	Age at the diagnosis of leukemia	Time to secondary neoplasm	Secondary neoplasm			
1	12,9	7,1	AML	-	+	Ile/Ile
2	8,5	20,4	meningioma	-	+	Ile/Ile
3	3,5	9,3	glioblastoma	+	+	Val/Val
4	5,5	8,5	osteosarcoma	+	+	Ile/Ile
5	3,5	9,8	NHL	+	-	Ile/Ile
6	6,3	10,0	NHL	-	+	Val/Val
7	5,2	8,7	fibrosarcoma	-	+	Val/Val
8	4,8	3,7	HD	+	+	Val/Val
9	4,2	9,4	meningioma	+	-	Ile/Ile
10	16	8,6	NHL	+	+	Ile/Val
11	6,3	7,6	glioblastoma	-	+	Val/Val
12	16,1	2,3	AML	-	+	Ile/Val
13	2,5	12,0	bazocelularni ca.	+	+	Ile/Ile
14	7,0	1,7	HD	+	-	Val/Val
15	1,5	16,6	astrocitoma	+	+	Ile/Ile
16	3,5	12,7	oligodendroglioma	-	+	Ile/Ile

GSTM1 - glutation S transferaze, Val - valin, Ile - izolevcin, AML - akutna mieloblastna levkemija / acute lymphoblastic leukemia, NHL - Ne-Hodgkinov limfom / Non Hodgkin's lymphoma, HD - Hodgkinov limfom / Hodgkin's disease

Razpr. 2. Razporeditev genotipov GSTM1, GSTT1, GSTP1 (kodon 105) in njihova povezava s pojavom sekundarnih novotvorb pri 16 bolnikih in 32 kontrolah.

Table 2. Distribution of GSTM1, GSTT1, GSTP1 (codon 105) genotypes and their correlation to second neoplasm occurrence in 16 patients and 32 controls.

		Primeri	Kontrole	P	Razmerje pričakovanja	95% IZ
		Cases (16)	Controls (N = 32)		Odds ratio	95% CI
GSTM1	+	9 (56%)	16 (50%)	0,768	1,28	0,38-4,29
	Null	7 (44%)	16 (50%)	(0,942)	(0,75)	(0,14-3,9)
GSTT1	+	13 (81%)	24 (75%)	0,729	1,44	0,32-6,40
	Null	3 (19%)	8 (25%)	(0,781)	(0,83)	(0,13-5,16)
GSTP1 _{codon105}	Ile/Ile	8 (50%)	12 (37%)	0,537	1,66	0,49-5,60
	Ile/Val or Val/Val	8 (50%)	20 (63%)	(0,991)	(0,66)	(0,11-3,98)

Razpravljanje

V naši populaciji bolnikov, zdravljenih zaradi akutne levkemije v otroštvu, je prevalenca genotipov GSTM1 in GSTT1 null 48% in 23%, kar je primerljivo s frekvenco, ugotovljeno v zdravi populaciji v Sloveniji, kjer je genotip GSTM1 null prisoten v 54%, genotip GSTT1 null pa v 24% (Vita Dolžan, osebna komunikacija). Podobne frekvence genotipa GSTM1 in GSTT1 null v belski rasi navajajo tudi druge študije (16, 17). Tudi frekvenca genotipa GSTP1_{codon105} je primerljiva s frekvencami v zdravi populaciji v Sloveniji, pri kateri je ugotovljeno razmerje genotipov: GSTP1 Ile₁₀₅/Ile₁₀₅ 49%, GSTP1 Ile₁₀₅/Val₁₀₅ 40%, GSTP1 Val₁₀₅/Val₁₀₅ 11%.

Rezultati naše študije ne kažejo povezave med delecijo genov GSTM1 ali GSTT1 ali polimorfizmom GSTP1 na kodonu 105 in pojavom sekundarnih novotvorb po zdravljenju akutne levkemije v otroštvu. Woo s sodelavci (18) pri 302 otrocih z akutno levkemijo, med katerimi jih je 57 razvilo levkemijo ali mielodisplastični sindrom, povezan z zdravljenjem pred tem, ni našel povezave med genotipoma GSTM1 ali GSTT1 null in z zdravljenjem povzročnim malignomom. Crumpova s sodelavci po-

roča o rahlo višji prevalenci delecije genov GSTM1 in GSTT1 med bolniki s sekundarno akutno mieloblastno levkemijo (AML) v primerjavi z bolniki, ki prvič zbolijo za AML, ali zdravo kontrolno skupino (19). Haase ugotavlja, da imajo bolnice z rakom dojke in dvojno null delecijo GSTM1 in GSTT1 zvečano tveganje za nastanek sekundarnih, z zdravljenjem induciranih novotvorb (20). Med našimi bolniki sta le dva s sekundarno AML in pri obeh ugotavljamo genotip GSTM1 null. Poleg sekundarnih hematoloških novotvorb so tumorji osrednjega živčevja med najpogostejšimi novotvorbami po zdravljenju otroške levkemije. Elexpuru-Camiruaga ugotavlja, da je genotip GSTT1 null dejavnik tveganja za astrocitom in meningiom, ki predstavljata pogosto neoplazmo CNS po zdravljenju levkemije v otroštvu, še posebej po profilaktičnem obsevanju osrednjega živčevja.

Sorazmerno majhno število bolnikov, vključenih v našo študijo, in histološka heterogenost sekundarnih novotvorb, nam ne omogočata natančneje analizirati povezavo genotipov GST s pojavom posameznih skupin tumorjev. Čeprav nismo uspeli dokazati povezave med genotipom GST in pojavom sekundarnih novotvorb, je mogoče, da bodo nadaljnje raziskave na področju polimorfizma genov, udeleženih pri presnovi citostatikov, uspeli opredeliti individualni profil tveganja za razvoj tako sekundarnih, z zdravljenjem povezanih novotvorb, kakor tudi za nastanek drugih neželenih učinkov zdravljenja.

Literatura

- Bhatia S, Buckley J, Robinson L. Second malignancies in childhood cancer. CCG Quarterly 1997; 5: 8-23.
- Inocenti F, Iyer L, Ratain MJ. Pharmacogenetics. A tool for individualizing antineoplastic therapy. Clin Pharmacokinet 2000; 39: 315-25.
- Morel F, Rauch C, Coles B, Le Ferrec E, Guillouzo A. The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. Pharmacogenetics 2002; 12: 277-86.
- Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1997; 6: 733-43.
- Elexpuru-Camiruaga J, Buxton M, Kandula V et al. Susceptibility to astrocitoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) and cytochrome P-450 (CYP2D6) loci. Cancer research 1995; 55: 4237-9.
- Hengstler JG, Arand M, Herrero ME, Oesch F. Polymorphism of N-acetyltransferase, glutathione S-transferase, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. Recent Results Cancer Research 1998; 154: 47-85.
- Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1997; 6: 733-43.
- Strange RC, Lear JT, Fryer AA. Polymorphism in glutathione S-transferase loci as a risk factor for common cancers. Arch Toxicol 1998; 72: Suppl: 419-28.
- Allan JM, Wild CP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ, Roddam PL, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy induced leukemia. PNAS 2001; 98: 11592-7.
- Rosario LA, O'Brien ML, Henderson CJ, Wolf CR, Tew KD. Cellular response to a glutathione S-transferase P1 activated prodrug. Molecular Pharmacology 2000; 58: 167-74.
- Ishimoto TI, Ali-Osman F. Allelic variants of the human glutathione S-transferase P1 gene confer differential cytoprotection against anticancer agents in Escherichia coli. Pharmacogenetics 2002; 12: 543-53.
- Standulla M, Schrape M, Mueller-Brechlin A, Zimmermann M, Welte K. Polymorphism within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. Blood 2000; 95: 1222-8.
- Aplenc R, Orudjev E, Swoyer J, Manke B, Rebbeck T. Differential bone marrow aspirate DNA yields from commercial extraction kits. Leukemia 2002; 16: 1865-6.
- Chen CL, Liu Q, Relling ML. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphism by polymerase chain reaction in American whites and blacks. Pharmacogenetics 1996; 6: 187-91.

15. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwin J. Molecular cloning, characterization and expression in *Escherichia coli* of full length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. *J Biol Chem* 1997; 272: 10004-12.
 16. Chen CL, Liu Q, Pui CH, Rivera GK, Sandlund JT, Riberiro R, Evans WE, Relling MV. Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997; 89: 1701-7.
 17. Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Lee BK, Spitz MR, Wang M, Xu X. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1243-5.
 18. Woo MH, Shuster JJ, Chen C, Bash RO, Behm FG, Camitta B, Felix CA, Kamen BA, Pui CH, Raimondi SC, Winick NJ, Amylon MD, Relling MV. Glutathione S-transferase genotypes in children who develop treatment-related acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 232-7.
 19. Crump C, Chen C, Appelbaum FR et al. Glutathione S-transferase Theta 1 gene deletion and risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 457-60.
 20. Haase D, Binder C, Bunger J et al. Increased risk for therapy-induced hematologic malignancies in patients with carcinoma of the breast and combined homozygous gene deletions of glutathione transferases M1 and T1. *Leukemia Research* 2002; 26: 249-54.
-