

GSTM1 Polimorfizmi İle Primer Beyin Tümörleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Serdal Arslan*, Mahir Budak*, Sami Bardakçı**

*Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 58140, Sivas

**Tepecik Sosyal Sigortalar Kurumu Hastanesi, Nöroşirürji Bölümü,
Gaziler Caddesi Yenişehir, İzmir

Received:26.01.2006, Accepted: 31.03.2006

Özet: GST (Glutasyon S- transferaz) ailesi, glutasyon ile endojen veya ekzojen hidrofobik elektrofillerin konjugasyonunu katalizleyen Faz II metabolizması enzimlerindedir. Bu enzimleri kodlayan genler insanlarda oldukça polimorfiktir. GSTM1 geni polisiklik aromatik hidrokarbonların detoksifikasyonunda rol alan μ sınıf izoenzimi kodlar. Homozigot delesyon sonucu oluşan GSTM1 O (null alel) genotipli bireylerde enzim katalitik aktivite göstermemektedir. Bazı çalışmalar GSTM1 null genotipi ile bazı kanser tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğunu göstermesine rağmen aksini gösteren çalışmalarda vardır. Bu çalışmada 144 Türk bireyde GSTM1 genotipi ile primer beyin tümörleri arasındaki ilişki araştırıldı (53 primer beyin tümörlü hasta, 91 kontrol). Hasta grubunda GSTM1 null genotipli bireyler kontrol grubuna göre daha yüksek oranda görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı [OR: 1.90, %95 CI = 0.92-3.96, $X^2 = 2.981$, P= 0,084]. Ayrıca GSTM1 polimorfizmi ile beyin tümörlü hastaların sigara içme durumu [OR:0,61 %95 CI = 0,19-1,91, P:0.39] ve histopatolojik beyin tümör tipleri (glioma ve meningioma) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmedi.

Anahtar Kelimeler: Glutasyon S-transferaz, Polimorfizim, Beyin tümörü

An Investigation of Corelation Between GSTM1 Polymorphism With Primary Brain Tumors

Abstract: The GST family is Phase II enzymes which catalyze the conjugation of glutathione to a wide variety of exogenous and endogenous chemicals with electrophilic functional groups. The genes encoding these enzymes show high polymorphism. The GSTM1 gene encodes GST- μ family which involves detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. Individuals having homozygous deletion of GSTM1 O (null allele) have enzymes with no catalytic activity. Some studies revealed a statistically significant association between the polymorphisms in the GSTM1 null genotype and some cancers, although contrary reports exist. In this study the association between polymorphisms in the GSTM1 and primary brain tumor incidence was investigated in 144 Turkish individuals (53 patient with primary brain tumor and 91 controls). Although frequency of patient with GSTM1 null genotype is higher than that of control group, no statistically significant association was found [OR: 1.90, %95 CI = 0.92-3.96, $X^2 = 2.981$, P= 0,084]. Polymorphisms in GSTM1 did not show statistically significant association with smoking status of the brain tumor patients and histopathologic types of brain tumor (glioma and meningioma) [OR:0,61 %95 CI = 0,19-1,91, P:0.39] .

Key Word: Glutathione S-transferase, Polymorphism, Brain tumor

1.Giriş

Glutatyon S- transferaz (GST) enzim sistemleri birçok farklı ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonu ve biyotransformasyonunda önemli rol oynayan Faz II metabolizması enzimlerindedir [1]. GST ailesinde bulunan sitozolik enzimler primer yapılarına göre α , μ , II, θ , δ olmak üzere beş sınıfa ayrılırlar [2]. İnsanda GST ailesine ait enzimleri kodlayan pek çok gen polimorfiktir [3]. Kromozomun 1p13 bölgesinde GST μ sınıf enzime ait beş sınıf gen (M1-M5) tespit edilmiştir. Bunlardan GSTM1 genine ait enzim, sigara dumanında bulunan karsinojenlerden, benzo [α] piren'nin hidroksilat metabolitleri ve epoksid bileşikler gibi polisiklik aromatik hidrokarbonların detoksifikasyonunda rol alan izoenzimdir [2].

GSTM1 lokusuna ait GSTM1*A , GSTM1*B ve GSTM1*O (null alel) olmak üzere üç alel tespit edilmiştir. GSTM1*A ve GSTM1*B lokusları benzer katalitik aktivite gösteren aktif enzimler oluşturabilirken, GSTM1'in homozigot delesyonu sonucu oluşan GSTM1*O (null alel) katalitik olarak aktif enzim oluşturamamaktadır [4]. GSTM1 null genotipe sahip bireylerin oranı Kafkas populasyonlarında ortalama %50 oranında görülürken, farklı etnik gruplarda %30-60 arasında değişen dağılım göstermektedir [4]. GST enzimlerinin detoksifikasyon metabolizmasında önemli

görevlere sahip olması nedeniyle, bu enzimleri kodlayan lokuslarda meydana gelen mutasyonların enzim aktivitesini değiştirmesi sonucu, bireylerde kanser riskinin artılabileceği düşünölmektedir [5]. Bazı alışmalarda GSTM1 null genotip ile meme, mesane, kolon kanser tipleri ve beyin tümörü gelişimi ilişkilendirilmiş olmasına rağmen [6-7], diğer alışmalar GSTM1 null genotipin kanser gelişimine katkısı olmadığını göstermektedir [8-9]. Ayrıca sigara kullanımına bağlı bazı kanserlerin gelişimine GSTM1 null genotipin etkisi tartışmalı bir konudur [6-10-11-12]. Bazı çalışmalarda farklı histopatolojik tip beyin tümörü gelişiminde GSTM1 null genotip etkisi istatistiksel olarak önemli bulunurken diğerlerinde önemsiz bulunmuştur [6-10].

Bu alışma ile Türk popülasyonunda beyin tümör gelişimi ile GSTM1 null genotipi arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca sigara kullanımını ve farklı histopatolojik tip beyin tümörü gelişimi ile GSTM1 null genotipi arasındaki ilişki ortaya konmaya çalışılmıştır.

2. Deneysel Yöntem

2.1-Çalışılan Popülasyon

Bu alışma 144 Türk bireyde yapılmıştır. Beyin Tümörlü hastalara (53) ait örnekler 2002 ve 2004 yılları arasında İzmir Tepecik SSK hastanesinden sağlanmışır. Kontrol grubu (91) kanser gibi önemli bir hastalığı olmayan Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesine gelen bireylerden sağlanmışır. Tümör tipleri WHO (Dünya Sağlık Örgütü)'nun belirlediği standartlara göre sınıflandırılmışır. Hasta ve kontrol grubundaki katılımcılardan sigara içme durumu, yaş, cinsiyet ve ailesinde kanser hikayesi olup olmadığına dair bilgiler elde edilmiştir.

2.2-DNA İzolasyonu ve GSTM1 Genotiplerinin Belirlenmesi

Kan örnekleri EDTA'li tüplere yaklaşık bir ml kadar alınmıştır. DNA izolasyonu için örnekler üzerine 500ml. STE (0,1 M NaCl, 0,05 M Tris ve 0,01 M EDTA, pH: 8) tamponu, 25 µl. Proteinaz K, 30 µl. SDS (Sodyum dedosil sülfat) (% 10) ilave edilerek, 55 °C de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra iki defa PCI (Fenol-klorofom-izoamil alkol, 25:24:1,500 µl) karışımından geçirilip, üzerlerine 1000 µl. soğuk etil alkol ilave edildi. Alkol uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen DNA, 100 µl. distile suda çözölerek spektrofotometrede konsantrasyonu okundu.

PCR metodu ile GSTM1 (+/+) ve GSTM1 null genotipleri belirlendi. r BAT geni ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. PCR ürünü olarak GSTM1 (+/+) genotipi 273 bç fragment oluştururken, r BAT geni aynı bağlanma sıcaklığında 365 bç'lik fragment oluşturmaktadır [Şekil 1]. GSTM1 (+/+) genotipi için F: 5' -CTG CCC TAC TTG GAT TGA TGG G-3', R 5-TGG ATT GTA GCA GAT CAT GC-3 ve r BAT geni için F: 5' -AGA GAG GGC AAT GAT GGC TA-3', R : 5' GAA GGC ACT CCG AAG ACA TAA - 3' primerleri kullanıldı.

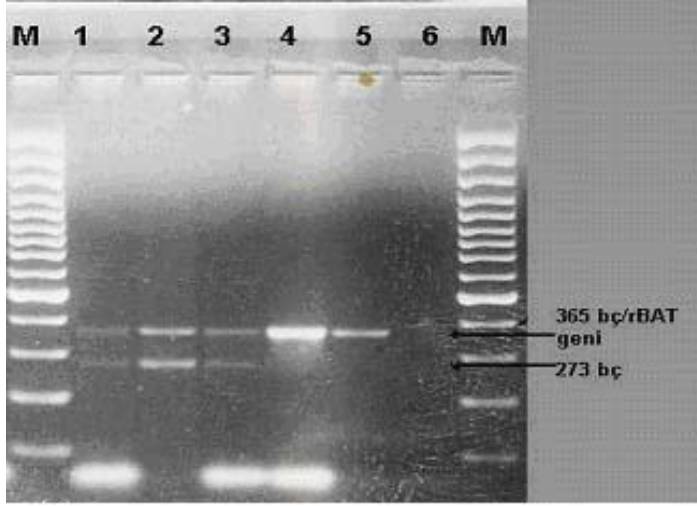
PCR 25 µl lik bir hacimde hazırlandı. Bu hacimde 100 ng DNA, 10 pmol her bir primerden, 0.2 mM her dNTP den, 2 mM MgCl, 0.5 U Taq DNA polimeraz [MBI fermentas] kullanılmıştır. Amplifikasyon şartları; Başlangıç denatürasyon 94 °C de 2 dk, denatürasyon 94 °C de 1 dk, bağlanma sıcaklığı 60 °C de 1 dk, uzama 72 °C de 1 dk, son uzama 72 °C de 5 dk olarak 30 döngüde tamamlandı. Amplifiye olmuş PCR ürünleri % 2'lik ethidium bromid'li agaroz jelde görüntülendi.[Şekil 1]

2.3-İstatistiksel Analiz

İstatistik analiz GSTM1 genotipleri ile, beyin tümörleri arasında, histopatolojik beyin tümör tipleri arasında ve sigara içme durumu arasındaki ilişkileri belirlemek amacı ile yapıldı. Bütün analizlerde SPSS (Versiyon 8.0) kullanılarak ki-kare (X^2), P değerleri ve %95 güven aralığında (CI) Risk katsayısı [OR] değerleri hesaplandı.

3. Bulgular

Toplam 91 kontrol ve 53 beyin tümörlü hastadan olmak üzere toplam 144 kişiden oluşan populasyonda GSTM1(+/+) ve GSTM1 (null) genotipler belirlendi. Çalışılan populasyonun özellikleri Tablo 1 de verilmiştir.



Şekil 1. Çoklu PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü. 273 bç GSTM1 normal alelini göstermektedir. 4, 5 ve 6. sıralarda sadece 365 bç uzunluğundaki rBAT geni bantları görülmektedir (M:Moleküler Büyüklük Belirteçi, 100 bç).

Kontrol grubuna ait 38 birey erkek (%41), 53 birey ise dişidir (%59). Beyin tümörlü hastalardan 22 birey erkek (%42), 31 birey ise dişidir (%58). Kontrollerin yaşları 16 ile 82 arasında değişirken, ortalama yaş 41.84 tür. Erkeklerin yaş ortalaması (44.16), dişi bireylerden daha yüksektir. Hasta bireylerin yaş aralığı 18 ile 78 arasında değişirken ortalama yaş 49.25 dir. Kontrol grubuna benzer şekilde hasta grubunda erkek bireylerin oranı daha yüksektir. Kontrollerden 24 birey sigara içerken, bunların 15 bireyi erkek 9 bireyi ise dişidir. Hasta grubunda ise 20 birey sigara içmekte ve bunlardan 15 birey erkek, 5 birey ise dişidir.

Tablo1: Beyin tümörlü hasta bireylerin ve kontrollerin özellikleri

| | Kontrol | Hasta |
|---------------------------|----------|----------|
| Örnek Büyüklüğü | 91 | 53 |
| Cinsiyet | | |
| Erkek | 38 [%41] | 22 [%42] |
| Dişi | 53 [%59] | 31 [%58] |
| Yaş | | |
| Yaş aralığı | 16-82 | 18-78 |
| Ortalama | 41.84 | 49.25 |
| Erkek | 44.16 | 51.18 |
| Dişi | 40.17 | 47.87 |
| Sigara İçme Durumu | | |
| Sigara İçen | 24 [%26] | 20 [%38] |
| Erkek | 15 [%62] | 15 [%75] |
| Dişi | 9 [%38] | 5 [%25] |
| Beyin Tümör Tipi | | |
| Meningioma | - | 15 [%28] |
| Glioma | - | 24 [%46] |
| Diğerleri* | - | 14 [%26] |

* Diğerleri (pituitary adenoma, medulloblastoma, craniopharyngioma)

Hasta ve kontrollere ait GSTM1 genotip dağılımı Tablo 2 de verilmiştir. GSTM1 null genotip kontrol bireylerin % 25 inde görülürken, hasta bireylerin ise % 38'inde görülmüştür. GSTM1 null genotip ile beyin tümörü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemekle birlikte bu genotipe sahip bireyler yaklaşık iki kat daha fazla risk taşımaktadır (OR: 1.90, %95 CI = 0.92-3.96, $X^2 = 2.981$, P= 0.084).

Tablo 2: GSTM1 genotipleri ile beyin tümörlü hasta ve kontrollerin karşılaştırılması

| Genotip | Kontrol | Hasta |
|-----------------------------|------------------|--------------|
| N | 91 (%100) | 53(%100) |
| GSTM1 | | |
| + / + | 69(%75) | 33(%62) |
| Null | 22(%25) | 20(%38) |
| P değeri | 0.084 | |
| X² değeri | 2.981 | |
| OR (%95 CI) | 1.90 (0.92-3.96) | |

Beyin tümör tiplerini histopatolojik özelliklerine göre gruplara ayırarak GSTM1 null genotipi ile ilişkisini araştırdık. Beyin tümörlerinin histopatolojik tipine göre yaygın olarak görülen meningioma, glioma ile bu iki gruba dahil olmayanlar olmak üzere üç gruba ayrıldı. Hasta grubunda 15 birey meningioma, 24 birey glioma ve 14 birey ise diğer tümör tiplerinden bulunmaktadır [Tablo 1]. Beyin tümörlü hastalara ait GSTM1 null genotipi ile hem meningioma tümör tipine sahip olanlar (OR :1,10 %95 CI: 0.34-3.55, P: 0.87) hem de glioma beyin tümör tipleri arasında (OR: 0.99, %95 CI: 0.66-2.68, P: 0.98) istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamadı.

Tablo 3: GSTM1 genotipi ile beyin tümör tipleri arasındaki ilişki

| Genotip | Hasta | Meningioma | Glioma | Diğerleri |
|-----------------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| N | 53(%100] | 15(%28) | 24 (%46) | 14(%26) |
| GSTM1 | | | | |
| + / + | 33(%62) | 9 (%27) | 15(%46) | 9(%26) |
| Null | 20(%38) | 6 (%30) | 9(%45) | 5(%25) |
| Pdeğeri | 0.87 | | 0.98 | |
| X² değeri | 0.25 | | 0.0 | |
| OR (%95CI) | 1.10 (0.34-3.55) | | 0.99 (0.66-2.68) | |

Biz ayrıca GSTM1 genotipleri ile sigara içme durumu arasındaki ilişkiyi araştırdık [Tablo 4]. GSTM1 için OR oranı 0.61 (%95 CI: 0.19–1.91) tespit edildi. GSTM1 null genotipi ile sigara içme durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilemedi ($P=0.39$, $X^2 =0.72$).

Tablo 4: GSTM1 ile beyin tümörlü hastaların sigara içme durumu arasındaki ilişki.

| Genotip | GSTM1 | |
|--------------------------------|------------------|------|
| | +/+ | Null |
| Sigara içenler [n=20] | 11 | 9 |
| Sigara içmeyenler[n=33] | 22 | 11 |
| X² | 0.72 | |
| P değeri | 0.39 | |
| OR (%95 CI) | 0.61 (0.19-1.91) | |

4.Tartışma

GST'ler geniş çaplı kanserojen bileşiklerin detoksifikasyonunda görev alan ve DNA zararına karşı dokuları koruyan enzimlerdir. Bu enzimler ilaçlar, yiyecek bileşenleri ya da yiyecek katkı maddeleri ile vücuda alınan toksik ve kanserojenik bileşiklere karşı dokuları korumaktadır. GST'lere ait genlerin homozigot delesyonu sonucu oluşan alellerin (örneğin, GSTM1*O) elektrofilik karsinojenleri etkili bir şekilde elimine edememesi sonucu, tümör gelişimine neden olabilmektedir [4-5]. Farklı kanser tipleri ile GSTM1 genotipleri arasındaki ilişki birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen, beyin tümörleri ile çok az çalışma vardır. Sınırlı sayıdaki çalışmaların bazıları GSTM1 null genotipi ile beyin tümör gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermesine rağmen [6-13-14] diğer bazı çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemektedir [15-16]. Bizim çalışmamız 91 kontrol ve 53 beyin tümörlü hastayı temel almıştır. Beyin tümörlü hastalar incelendiğinde %38 oranında GSTM1 null genotipi görülmüştür. Kontrol grubunda GSTM1 null genotipi % 25 oranında görülmüştür. Hasta bireylerde GSTM1 null genotip oranı, kontrol bireylerden yüksek oranda görülmüş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir (OR: 1.90, P=

0.084). Ayrıca bizim sonuçlarımız GSTM1 null genotipi ile beyin tümör gelişimi arasında ilişki göstermeyen çalışmalarla daha uyumlu görülmektedir.

Bazı çalışmalarda GSTM1 null genotipi hem meningioma hem de glioma beyin tümör tipleri arasında ilişki olmadığı saptanmıştır [15-17-18]. Ancak Perrett ve ark. adenoma beyin tümör tipi ile GSTM1 null genotipi arasında anlamlı ilişki olduğunu göstermişlerdir [13]. Pınarbaşı ve ark. bir Türk populasyonunda yaptığı çalışmada GSTM1 null genotipi ile histopatolojik beyin tümör tipleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir [6]. Bizim çalışmamızda benzer sonuçlar vermiş ve GSTM1 null genotipi ile beyin tümör tipleri arasında anlamlı ilişki görülmemiştir [Tablo 3]. GSTM1'in sigarada bulunan karsinojenik bileşiklerin detoksifikasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Bazı çalışmalarda sigara içen bireylerde beyin tümörü gelişimi ile sigara içme arasında bir ilişki görülmemesine rağmen, diğer çalışmalarda sigara içen bireylerde beyin tümör gelişim riskinin arttığı görülmüştür [19-20]. Çalışmamız sonucunda beyin tümör gelişimi ile sigara içme durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamış olmasına rağmen GSTM1 null genotipe sahip, beyin tümörlü hastalarda sigara içenlerin oranı daha yüksektir (OR:0.61, %95 CI :0.19–1.91).

Kanser tipleriyle detoksifikasyon metabolizmasında görev alan enzimleri kodlayan genler arasındaki ilişkinin gösterilmesi, değişik kanserler tiplerinde risk grubunda olan insanların belirlenmesi açısından önemlidir. Beyin tümör gelişiminin bazı çalışmalarda GSTM1 null genotipinin ilişkili olması, diğerlerinde ilişki gösterilmemesi bu konu ile ilgili daha büyük hasta ve kontrol grupları ile çok sayıda araştırma yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

5. Teşekkür

Bu çalışmanın yapılmasında birikimlerinden yararlandığımız Doç. Dr. Fevzi Bardakcı'ya teşekkür ederiz

6. Kaynaklar

1. B. Mannervik, *Adv. Enzymol.* **1985**, 57:357-417
2. J.D. Hayes, D.J. Pulford, *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **1995**, 30:445-600
3. A. Hirvonen, *Environ Health Perspect*, **1999**, 107 [Suppl 1]; 37-47
4. T.R. Rebbeck, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **1997**, 6:733-743

5. A. d'Errico, E.Taioli, X. Chen, P. Vineis, **1996**, *Biomarkers*,1:149-173.
6. H. Pınarbaşı, Y. Silig, M. Gürelik, **2005**, *Cancer Genet Cytogenet*, 156:144-149.
7. S. Zhong, A.H. Wyllie, D. Barnes, C.R. Wolf, N.K. Spurr, **1993** *Carcinogenesis*; 14:1821-24
8. S.M. Shanly, G. Chenevix-Trench, J. Palmer, N. Hayward, **1995**, *Carcinogenesis*; 16: 2003-2004.
9. M.W. Yu, A.Gladek-Yarborough, S. Chiamprasert, R.M. Santella, Y.F. Liaw, C.J. Chen, **1995**, *Gastroenterology*; 109:1266-1273,
10. F. Bardakci, E. Canbay, N. Değerli, L. Çoban, E.I. Canbay, **2003**, *J Cell Mol Med Vol 7*, No 3: 307-312.
11. M. Lee, M. Wrensch, R. Miike, **1997**, *Cancer Causes Control*, 8:13-24.
12. J.D. Burch, K.J. Craib, B.C. Choi, A.B. Miller, H.A. Risch, G.R. Howe, **1987** *J Natl Cancer Inst*; 78:601-9.
13. C.W. Perrett, R.N. Clayton, M. Pistorello, M. Boscaro, M. Scanarini, A.S. Bates, N. Buckley, P. Jones, **1995**, *Carcinogenesis* 16:1643-1645.
14. R. Ezer, M. Alonso, E. Pereira, M. Kim, J.C. Allen, D.C. Miller, E.W. Newcob, **2002**, *J. Neuroocol*, 59:123-34.
15. J. Elexpuru-Camiruaga, N. Buxton, V. Kandula, P.S. Dias, D. Campbell, J. McIntosh, J. Broome, P. Jones, A. Inskip, J. Alldersea, A.A. Fryer, R.C. Strange, **1995** *Cancer Res.*, 55: 4237-4239.
16. Z. Trizna, M. de Andrade, A.P. Kyritsis, K. Briggs, V.A. Levin, J.M. Bruner, Q. Wei, M.L Bondy, **1988**, *Cancer Epidedemiol. Biomark. Prev.* 7:553-555.
17. P.A. Hand, A. Inskip, J. Gilford, J. Alldersea, J. Elexpuru-Camiruaga, J.D. Hayes, P.W. Jones, R.C. Strange, A.A. Fryer, **1996**, *Carcinogenesis*, 17: 1991-1922.
18. J.K. Wiencke, M.R. Wrensch, R. Miike, Z. Zuo, K.T. Kelsey, *Carcinogenesis*, **1997**, 18:1431 – 3.
19. M. Lee, M. Wrensch, R. Miike, **1997**, *Cancer Causes Control*, 8:13-24.
20. J.D. Burc, K.J. Craib, B.C. Choi, A.B. Miller, H.A. Risch, G.R. Howe, **1997**, *J Natl Cancer Ins*, 78:601-9.