

Uniwersytet Medyczny im. Piatów Śląskich we Wrocławiu
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

Katedra i Zakład Podstaw Nauk Medycznych

Polimorfizmy genu *receptora witaminy D (VDR)*, a ryzyko zespołu metabolicznego u dzieci i młodzieży leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej

Anna Wysoczańska-Klaczyńska

Promotor:

Dr hab. n. med. Ewa Barg

Wrocław 2022

STRESZCZENIE

Wstęp. Najczęściej rozpoznawanymi nowotworami wieku dziecięcego są białaczki (nowotwory układu krwiotwórczego), przy czym ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) stanowi blisko 80% białaczek w populacji osób poniżej 18 roku życia. Postęp w leczeniu tej choroby spowodował, że ponad 90% pacjentów z rozpoznaniem ALL przed 18 rokiem życia zostaje wyleczona. W leczeniu zwykle stosowana jest wielolekowa terapia, niekiedy dodatkowo radioterapia. Zastosowane chemioterapeutyki, w tym glikokortykosteroidy, mogą niekorzystnie wpływać na rozwój ozdrowieńców, szczególnie na nieprawidłową masę ciała, gospodarkę węglowodanową i lipidową. Dodatkowo, obciążenie rodzinne nadwagą, otyłością, hiperlipidemią, cukrzycą i nadciśnieniem stanowią czynniki ryzyka rozwoju zespołu metabolicznego (ZM) w przyszłości, podobnie jak witamina D i polimorfizmy genu *receptora witaminy D (VDR)*. Odpowiednio wczesna identyfikacja osób z predysponującym polimorfizmem genu *VDR* do zaburzeń metabolicznych i jego składowych ułatwi podjęcie działań profilaktycznych, co może mieć znaczący wpływ na zmniejszenie ryzyka powikłań terapii onkologicznych w przyszłości. Określenie genotypu może także ułatwić personalizację terapii onkologicznej.

Cel. Celem pracy była ocena wpływu polimorfizmów genu *VDR* [BsmI (rs1544410), FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232), TaqI (rs731236)] na występowanie zaburzeń metabolicznych i jego składowych u pacjentów będących po zakończonym leczeniu ALL.

Material i metody. Udział w badaniu zaproponowany został pacjentom Kliniki Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, którzy chorowali na ALL w latach 2003-2016. Przebadanych zostało 92 pacjentów w wieku od 5 do 30 lat. Grupę kontrolną stanowiło 89 zdrowych dzieci w tym samym przedziale wiekowym, nie

chorujących na ALL. Projekt badania uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (nr opinii KB-221/2018).

Aktualny stan zdrowia uczestników badania został oceniony na podstawie autorskiego kwestionariusza ankietowego. Uwzględniony został także wywiad rodzinny. W badanych grupach przeprowadzono pomiar ciśnienia krwi i parametrów antropometrycznych (wysokości i masy ciała, obwodu talii). Na tej podstawie wyliczono wskaźnik masy ciała – body mass index-BMI i wskaźnik Cole'a. Wartości badanych cech antropometrycznych zostały wyrażone w standaryzowanych odchyleniach standardowych. U uczestników badanych grup wykonano oznaczenia stężenia glukozy i insuliny na czczo, stężenia trójglicerydów, cholesterolu całkowitego, frakcji HDL, LDL, apolipoproteiny A (ApoA1), apolipoproteiny B (ApoB1), witaminy D. U wszystkich badanych oceniono występowanie polimorfizmów genu *receptora witaminy D (VDR)*: BsmI (rs1544410), FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232), TaqI (rs731236). Genotypowanie polimorfizmów genu *VDR* w DNA z limfocytów krwi obwodowej pacjentów oznaczano techniką SNaPshot.

Statystyczne opracowanie wyników wykonano w programie Statistica. We wszystkich analizach za poziom istotności statystycznej przyjęto $p \leq 0,05$.

Wyniki. Zespół metaboliczny wystąpił istotnie częściej u pacjentów grupy badanej w porównaniu do osób grupy kontrolnej (15,15% vs 4,05%). ZM rozpoznano wyłącznie u mężczyzn (10 z 44) grupy badanej oraz 1 kobiety z 42 i 2 mężczyzn z 32 grupy kontrolnej. Pacjenci będący po zakończonym ALL w porównaniu do osób grupy kontrolnej wykazują wyższe parametry wskaźnika HOMA-IR (4,51 vs 3,30), stężenia insuliny na czczo (19,9 vs 14,9 [μ IU/ml]) i witaminy D u osób poniżej 18lat (27,5 vs 25,3 [ng/ml]) oraz niższe stężenie ApoA1 (141,5 vs 152,3 [mg/dl]).

U pacjentów grupy badanej z rozpoznaniem ZM w porównaniu do pacjentów niewykazujących ZM odnotowano istotnie niższe stężenie witaminy D ($p=0,023$). Zaobserwowano w grupie leczonej protokołem ALL IC-BFM 2002 w porównaniu do ALL IC-BFM 2009 istotnie wyższe stężenie glukozy (90,00 vs 88,00 [mg/dl]), insuliny na czczo (21,4 vs 17,4[μ IU/ml]), wartość wskaźnika HOMA-IR (4,75 vs 3,81) i obwodu pasa u osób poniżej 18 roku życia (76,20 vs 66,00[c]) oraz istotnie niższe stężenie witaminy D (25,55 vs 31,6 [ng/ml]) i HSDS (-0,18 vs 0,29). Niedobór witaminy D <30 ng/ml i deficyt witaminy D <20 ng/ml witaminy D występował istotnie częściej w grupie badanej pacjentów leczonych według protokołu ALL IC-BFM 2002 w porównaniu do pacjentów leczonych protokołem ALL IC-BFM 2009 (70,8 vs 38,7%; 35,4% vs 3,2%).

ZM wystąpił istotnie częściej w grupie badanej osób z genotypem: TT polimorfizmu TaqI ($p=0,033$), GG polimorfizmu BsmI ($p=0,020$), GG polimorfizmu ApaI ($p=0,047$) w porównaniu z grupą kontrolną. Niższe stężenie HDL (nieprawidłowe) stwierdziłam istotnie częściej w grupie badanej osób z genotypem GG w porównaniu do grupy kontrolnej z genotypem GG ($p=0,042$).

Wnioski.

1. Pacjenci po zakończonym leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) w okresie dzieciństwa i młodości wykazują zwiększone ryzyko rozwoju zespołu metabolicznego (ZM) w kolejnych latach życia, wykazując wyższe wartości wskaźnika HOMA-IR, stężenia insuliny na czczo, niższe stężenie ApoA1 oraz w grupie poniżej 18 roku życia podwyższone rozkurczowe ciśnienie krwi.
2. Płeć męska predysponuje do rozwoju zespołu metabolicznego.
3. Modyfikowanie protokołów leczniczych w terapii ALL przyczynia się do zmniejszenia późnych następstw. Pacjenci leczeni protokołem ALL IC-BFM

2002 wykazują większe ryzyko wystąpienia zespołu metabolicznego w porównaniu do pacjentów leczonych protokołem ALL IC-BFM 2009.

4. Czynnikiem predysponującym do rozwoju zespołu metabolicznego u pacjentów po zakończonym leczeniu ALL wydaje się być stężenie witaminy D, stężenie witaminy D u osób z ZM jest niższe niż u pacjentów bez ZM.
5. Obecność polimorfizmów: TaqI (rs731236), BsmI (rs1544410) i ApaI (rs7975232) genu *VDR* może być czynnikiem predysponującymi do rozwoju zespołu metabolicznego u pacjentów z ALL.
6. Odpowiednio wczesna identyfikacja osób z predysponującym do zaburzeń met polimorfizmem genu *VDR* d stanowić powinna podstawę do podjęcia działań profilaktycznych, wdrożenia odpowiedniego stylu życia, większej aktywności ruchowej celem zminimalizowania skutków tych zaburzeń u pacjentów leczonych z powodu ALL, a także przyczynić się do prowadzenia terapii spersonalizowanej.
7. Wskazane byłoby prowadzenie dalszych badań w większej grupie pacjentów, którzy byli leczeni w dzieciństwie i okresie młodzieńczym, ale także u dorosłych osób leczonych z powodu ALL.

SUMMARY

Introduction. The most commonly diagnosed childhood cancer is leukemia, namely tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues. Among them, acute lymphoblastic leukemia (ALL) constitutes around 80% of leukemia cases in the population of people under 18 years of age. Advances in its treatment have resulted in more than 90% of patients with the diagnosis of ALL before the age of 18 being cured.

The treatment usually comprises multi-drug therapy and occasionally involves radiotherapy. The applied chemotherapeutics, including glucocorticosteroids, might adversely affect the development of the convalescents, especially bodyweight, both carbohydrate and lipid metabolism. Risk factors for the development of metabolic syndrome in the future comprise family burdens such as overweight, obesity, hyperlipidemia, diabetes, and hypertension as well as vitamin D and polymorphisms of the gene of the receptor for vitamin D (*VDR*). Early identification of individuals with polymorphism of *VDR* gene predisposing to metabolic disorders and its components might enable to take preventive measures. As the consequence, such action might have a significant influence on the risk decrease of complications following oncological therapies. Evaluation of the genotype could also facilitate the personalization of oncological therapy.

The aim of the study. The study aimed to assess the impact of *VDR* gene polymorphisms [BsmI (rs1544410), FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232), TaqI (rs731236)] on the incidence of metabolic disorders and their components in patients who are post-treated for ALL.

Material and methods. Participation in the study was offered to patients of the Clinical Department of Paediatric Bone Marrow Transplantation, Oncology, and Haematology at Wrocław Medical University who have suffered from ALL

between 2003 and 2016. 92 patients aged 5 to 30 were examined within the study. The Control group comprised 89 healthy children in the same age group not suffering from ALL. The study proposal obtained the approval of the Bioethics Committee at Wroclaw Medical University (review number: KB-221/2018).

The current condition of the participants of the study was assessed using an original survey questionnaire. Family history was also taken into account. In examined groups blood pressure and anthropometric parameters including height, weight mass, and waist size, were measured. Based on these data body mass index (BMI) and Cole's index were calculated. Values of the studied anthropometric parameters were expressed as standardized standard deviations.

In participants within tested groups, the following parameters were determined: fasting blood glucose and insulin concentration, the concentration of triglycerides, total cholesterol, HDL and LDL fraction, apolipoprotein A (ApoA1), apolipoprotein B (ApoB1), and vitamin D. All participants were assessed for the presence of polymorphisms of the gene of the receptor for vitamin D (VDR): BsmI (rs1544410), FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232) and TaqI (rs731236). Genotyping of VDR gene polymorphisms in DNA retrieved from peripheral blood lymphocytes was performed using the SNaPshot technique.

Statistical analysis of the data was performed using Statistica. In all analyses p-value <0.05 was considered statistically significant.

Results. Metabolic syndrome occurred significantly more frequently in patients in the study group compared to the control group (15,15% vs 4,05%). Metabolic syndrome was diagnosed only in male participants within the study group (10 out of 44) whereas in the control group it was recognized in 1 out of 42 women and 2 out of 32 men. Patients post-treated for ALL in comparison to the control group demonstrated higher values of HOMA-IR index (4,51 vs 3,30), fasting insulin concentration (19,9vs 14,9[μ IU/ml]) and vitamin D concentration in individuals

under 18 years of age (27,5 vs 25,3 [ng/ml]) and lower concentration of ApoA1 (141,5 vs 152,3 [mg/dl]).

In patients within the study group with diagnosed metabolic syndrome compared to those not demonstrating metabolic syndrome significantly lower vitamin D concentration was detected ($p=0,023$). Upon collating a group of patients treated with ALL IC-BFM 2002 protocol with a group of patients treated with ALL IC-BFM 2009 protocol it has been observed significantly higher values of fasting glucose concentration (90,00 vs 88,00 [mg/dl]), fasting insulin concentration (21,4 vs 17,4 [μ IU/ml]), HOMA-IR index (4,75 vs 3,81) and waist measurement in individuals under 18 years of age (76,20 vs 66,00 [cm]) and significantly lower concentration of vitamin D (25,55 vs 31,6 [ng/ml]) and HSDS (-0,18 vs 0,29).

Vitamin D deficiency <30 ng/ml and vitamin D deficit <20 ng/ml appeared significantly more frequently in a group of patients treated with ALL IC-BFM 2002 protocol in comparison to a group of patients treated with ALL IC-BFM 2009 protocol (70,8 vs 38,7% and 35,4% vs 3,2% respectively). Metabolic syndrome was diagnosed significantly more often in the individuals within the study group characterized by the following genotype: TT polymorphism TaqI ($p=0,033$), GG polymorphism BsmI ($p=0,020$), GG polymorphism ApaI ($p=0,047$) compared to the control group. A lower concentration of HDL which is defined as abnormal was detected significantly more frequently in the individuals exhibiting GG polymorphism in the study group in comparison to the individuals exhibiting GG polymorphism in the control group ($p=0,042$).

Conclusions:

1. Patients who were treated for ALL during childhood and adolescence have an increased risk of developing metabolic syndrome in subsequent years of life by demonstrating higher levels of HOMA-IR index, fasting insulin

concentration, lower values of ApoA1, and an elevated diastolic blood pressure in the group under 18 years of age.

2. Male sex predisposes to develop metabolic syndrome.
3. Modification of treatment protocols for ALL therapy contributes to reducing late consequences. Patients treated with ALL IC-BFM 2002 protocol show a higher risk of incidence of metabolic syndrome in comparison to the patients treated with ALL IC-BFM 2009 protocol.
4. Vitamin D concentration appears to be a predisposing factor for the development of metabolic syndrome in patients post-treated for ALL since in the group diagnosed with metabolic syndrome the level of vitamin D is lower than in the group not demonstrating metabolic syndrome.
5. The presence of VDR gene polymorphisms such as TaqI [rs731236], BsmI [rs1544410], and ApaI [rs7975232] might be a predisposing factor for the development of metabolic syndrome in patients with ALL.
6. Early identification of people with predisposing metabolic disorders VDR gene polymorphism should be the basis for taking preventive measures, implementing an appropriate lifestyle and bigger physical activity to minimize effects of those disorders in patients treated for ALL and also to contribute to the initiation of personalized therapy.
7. It would be advisable to conduct further research in a larger group of patients who were treated for ALL during childhood and adolescence and additionally to extend the study to adults treated for ALL.