

ปก ๖๑

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุศาสตร์ของยีน *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* และ *NQO1* กับการ
สัมผัสสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและความเสี่ยงในการเกิดโรค
acute lymphoblastic leukemia ในเด็กไทย

นางสาวภัทรมน อึ้งบำเหน็จ

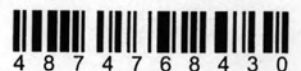
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 8 7 4 7 6 8 4 3 0

INTERACTION BETWEEN *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* AND *NQO1* GENETIC
POLYMORPHISMS AND PESTICIDES EXPOSURE AS RISK FACTORS FOR
ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN THAI CHILDREN

Miss Pattramon Aungbamnet

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

502117


Thesis Title INTERACTION BETWEEN *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* AND
NQO1 GENETIC POLYMORPHISMS AND PESTICIDES
EXPOSURE AS RISK FACTORS FOR ACUTE
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN THAI CHILDREN

By Miss Pattramon Aungbamnet

Field of study Medical Science

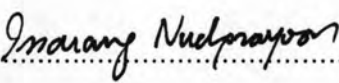
Thesis Advisor Associate Professor Issarang Nuchprayoon

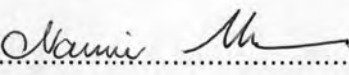
Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

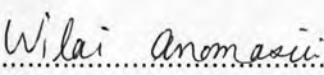

.....Dean of the Faculty of Medicine
(Associate Professor Adisorn Patradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Professor Apiwat Mutirangura, M.D. Ph.D.)


.....Thesis Advisor
(Associate Professor Issarang Nuchprayoon, M.D., Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Narin Hiransuthikul, M.D., Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Wilai Anomasiri, Ph.D.)

ภัทรมน อิงบำเหน็จ : ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุศาสตร์ของยีน *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* และ *NQO1* กับการสัมผัสสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและความเสี่ยงในการเกิดโรค acute lymphoblastic leukemia ในเด็กไทย (INTERACTION BETWEEN *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* AND *NQO1* GENETIC POLYMORPHISMS AND PESTICIDES EXPOSURE AS RISK FACTORS FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN THAI CHILDREN) อ. ที่ปรึกษา : รศ.นพ.อิศรางค์ นุชประยูร, 66 หน้า

มะเร็งเม็ดเลือดขาว acute lymphoblastic leukemia (ALL) เป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดของมะเร็งที่พบในเด็ก สาเหตุของการเกิด ALL มีหลายปัจจัยซึ่งอาจเกิดจากความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายสารก่อมะเร็ง คือเอนไซม์พวก xenobiotic-metabolizing เช่น cytochrome P-450 (*CYP*), glutathione-S-transferase (*GST*) และ NAD(P)H: quinone oxidoreductase (*NQO1*) ร่วมกับการกระตุ้นจากสารก่อมะเร็งต่างๆที่อยู่ในสภาพแวดล้อม เช่น สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสารฆ่าแมลงอาจเพิ่มความเสี่ยงที่จะเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL ในเด็กไทย ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิสมของยีน *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1*, *NQO1* และการสัมผัสสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชจำพวกสารฆ่าแมลงภายในบ้านของมารดาด้วยความเสี่ยงในการเกิด ALL ในเด็กไทย โดยการสัมภาษณ์มารดาเปรียบเทียบระหว่างคนไข้เด็กที่เป็น ALL จำนวน 139 รายกับเด็กที่ไม่เป็นโรคมะเร็งจำนวน 139 ราย โดยศึกษาแบบ matched case-control ผลการศึกษาพบว่าโพลีมอร์ฟิสมของยีนชนิด *GSTM1* null ร่วมกับ *CYP1A1**2A เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรค ALL (OR=2.48, 95% CI 1.24-4.97) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิสมชนิดอื่นกับมะเร็ง ALL ส่วนในการศึกษาการสัมผัสสารฆ่าแมลงภายในบ้านกับความเสี่ยงในการเกิดโรค ALL พบว่าการใช้สารฆ่าแมลงภายในบ้านของมารดามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค ALL (OR=2.29, 95% CI 1.54-3.47) จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าโพลีมอร์ฟิสมของยีนชนิด *GSTM1* ร่วมกับ *CYP1A1**2A และการสัมผัสสารฆ่าแมลงภายในบ้านของมารดาอาจมีความสัมพันธ์ในการเพิ่มปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรค ALL ในเด็กไทย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ลายมือชื่อนิสิต..... ภัทรมน อิงบำเหน็จ
ปีการศึกษา 2550ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อิศรางค์ นุชประยูร

487 47684 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA / XENOBIOTIC-METABOLIZING ENZYMES (XME) / PESTICIDES

PATTRAMON AUNGBAMNET : INTERACTION BETWEEN *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* AND *NQO1* GENETIC POLYMORPHISMS AND PESTICIDES EXPOSURE AS RISK FACTORS FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN THAI CHILDREN. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ISSARANG NUCHPRAYOON, M.D., Ph.D., 66 pp.

Acute lymphoblastic leukemia is the most common cancer in childhood. Many factors including xenobiotic-metabolizing enzymes genetic polymorphisms (e.g., cytochrome P-450 (*CYP*), glutathione-S-transferase (*GST*), or NAD(P)H: quinone oxidoreductase (*NQO1*), and the environment factors (e.g., pesticides, herbicides, or insecticides) are associated with increased risk of childhood ALL. In this study, we determined the relationship between the polymorphisms in genes encoding -metabolizing enzymes *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* and *NQO1*, and pesticides exposure and the risk for ALL in 139 children with ALL and 139 age-sex-matched children. We found that combination of *GSTM1* null and *CYP1A1*2A* were both found to be significantly associated with increased risk of ALL (OR=2.48, 95% CI 1.24-4.97), but not *GSTT1*, *CYP1A1*2B* or *NQO1*, history of pesticides exposure was also significantly associated with increased risk of ALL (OR=2.29, 95% CI 1.54-3.47). These results suggest that the combined effect of polymorphisms in *GSTM1* and *CYP1A1*2A* gene and pesticides exposure factor might contribute to increased risk of ALL in Thai children.

Field of study: Medical Science Student's signature: *Pathamon Aungbarnet*
 Academic year: 2007 Advisor's signature: *Issarang Nuchprayoon*

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude to all those who made the completion of this thesis possible. I want to thank the Committee of the Medical Science Program for giving me permission to commence this thesis and conduct the necessary research work. I am deeply indebted to my advisor, Associate Professor Dr. Issarang Nuchprayoon, for his support and invaluable advice. His excellence in the molecular genetics of leukemia improved my own knowledge and skills.

My grateful appreciation is extended to Associate Professor Narin Hiransuthikul and Associate Professor Samart Pakakasama, for their stimulating guidance in this study and I express my appreciation to my other committee members and Associate Professor Wilai Anomasiri for their helpful suggestions and insightful comments during my study.

I feel profoundly indebted to Associate Professor Panya Seksarn and Dr. Darintr Sosothikul and technicians and all members in hematology laboratory of department of pediatric, faculty of medicine, Chulalongkorn University for their suggestion and support.

I am really thankful to Miss Piyanut Sripayab, Miss Chalisa Louicharoen and all members in the Snake Venum Unit, Filariasis Unit for their encouragement, sincerity and friendship. I wish to express my special thanks to Associate Professor Narin Hiransuthikul for his helpful on analysis data.

I am also thankful to Mrs. Nittaya Thong-oun and Mrs. Umaporn and all members in laboratory of department of pediatric, faculty of medicine, Chulalongkorn University for their assistance in collection specimens.

This thesis was partially supported by Ministry of University Affairs Funds.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents, my sisters and Miss Ganntapa Premkamol for their love, support and understanding.

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
TABLE OF CONTENTS.....	vii, viii, ix
LIST OF TABLE.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xii, viii
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
1. Background and Rationale.....	1
2. Research Questions.....	4
3. Objective of the Study.....	4
4. Hypothesis.....	5
5. Key Words.....	5
6. Conceptual Framework.....	5
7. Expected Benefits and Applications.....	5
II LITERATURE REVIEW.....	6
Acute lymphoblastic leukemia.....	6
Leukemia in Thailand.....	7
Classification of Acute leukemia.....	12
Xenobiotic enzymes (Detoxification enzymes).....	14
Cytochrome P-450 (CYP).....	15
NAD (P) H quinine oxidoreductase: <i>NQO1</i>	17
Glutathione-S-Transferase (<i>GSTs</i>).....	18
Pesticides.....	22

	Page
CHAPTER	
III MATERIALS AND METHODS.....	24
1. Materials.....	24
Population Study.....	24
Collecting Specimen.....	24
DNA Extraction.....	24
Identification of Xenobiotic-metabolizing enzymes gene polymorphisms.....	25
Chemicals.....	26
Work Outline.....	27
2. Methods.....	28
Extraction of Genomic DNA from Blood Sample.....	28
Identification of <i>CYP1A1</i> (m1) Polymorphisms.....	28
Identification of <i>CYP1A1</i> (m2) Polymorphisms.....	28
Identification of <i>NQO1</i> Polymorphisms.....	29
Identification of <i>GSTM1</i> Deletion.....	29
Identification of <i>GSTT1</i> Deletion.....	30
Data Collection.....	30
Data analysis.....	31
IV RESULTS.....	32
Identification of <i>CYP1A1</i> Polymorphisms.....	35
Identification of <i>NQO1</i> Polymorphisms.....	37
Identification of <i>GSTM1</i> Polymorphisms.....	39
Identification of <i>GSTT1</i> Polymorphisms.....	41
Characteristics of the Pesticides Exposure.....	42

	Page
CHAPTER	
V CONCLUSION AND DISCUSSION.....	45
REFERENCES.....	49
APPENDIX A.....	57
APPENDIX B.....	61
APPENDIX C.....	63
BIOGRAPHY.....	66

LIST OF TABLES

Table	Page
1 Incidences of Cancers in Childhood, Both Sexes, Thailand 2003.....	9
2 Acute Lymphoblastic Leukemia Subtype (WHO).....	12
3 Oligonucleotides and their descriptions.....	25
4 Restriction enzymes and buffer.....	26
5 Characteristics of the genetic variants.....	34
6 Genotype frequencies of <i>CYP1A1</i> (m1), <i>CYP1A1</i> (m2), and <i>NQO1</i> polymorphisms in cases-controls.....	34
7 Allele frequencies of <i>CYP1A1</i> (m1), <i>CYP1A1</i> (m2), <i>NQO1</i> polymorphisms in cases and controls.....	36
8 Distribution of <i>CYP1A1</i> genotypes in ALL patients and controls.....	37
9 Frequencies of <i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i> polymorphisms in cases-controls.....	39
10 Combined effects of <i>GSTM1</i> and <i>CYP1A1*2A</i> allele in cases and controls.....	42
11 Demographic data of pesticide exposure for the childhood ALL cases and controls.....	43
12 Type of pesticides exposure distribution for the childhood ALL cases and controls.....	43
13 Timing of pesticides exposure distribution for the childhood ALL cases and controls.....	44

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Molecular subclassification of childhood leukemia.....	2
2 Bone marrow aspirated from a child with T-cell acute lymphoblastic leukemia.....	6
3 Bone marrow aspirate from a child with B-cell acute lymphoblastic leukemia.....	7
4 Age-adjusted incidence rates for childhood cancer by ICCC group.....	8
5 Age-adjusted incidence rates for childhood cancer by age & ICCC group.....	11
6 Immunophenotyping by flow cytometry.....	13
7 Xenobiotic-metabolizing enzymes pathway or detoxification pathway.....	15
8 Genetic polymorphisms of <i>CYP1A1</i> gene.....	16
9 Genetic polymorphisms of <i>NQO1</i> gene.....	18
10 Structure of the <i>GSTM1</i> Homologous recombination.....	20
11 Structure of the <i>GSTT1</i> Homologous recombination.....	21
12 Pie chart representing prevalence of childhood acute lymphoblastic leukemia.....	32
13 PCR-RFLP of <i>CYP1A1</i> T3801C (m1) and A2455G (m2).....	35
14 PCR-RFLP of <i>NQO1</i> C609T.....	38
15 PCR amplification of <i>GSTM1</i> gene in ALL samples.....	40
16 PCR amplification of <i>GSTT1</i> gene in ALL samples.....	41

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	base pairs
°C	degree Celsius
cm	centimeter
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
F	forward primer
g	gram (s)
hr(s)	hour (s)
kb	kilobase
M	molar
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
N	normal
ng	nanogram
nm	nanometer
OD	optical density
pmol	picomole
PCR	polymerase chain reaction
RNase	ribonuclease
RFLP	restriction fragment length polymorphism
rpm	revolution per minute

sec	second
Tris-HCl	tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
UV	ultraviolet
WHO	World Health Organization
μg	microgram
μl	microlitre
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume