

DINAMIKA DOLŽINE TELOMEROV V LEVKOCITIH PO ZDRAVLJENJU Z OBSEVANJEM PRI RAKU DOJK

Tanja Marinko^{1,2}, Sara Redenšek Trampuž³, Ana Trstenjak⁴, Vita Dolžan³, Katarina Trebušak Podkrajšek³, Katja Goričar³

¹ Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁴ Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

Email: tmarinko@onko-i.si

Izvleček

Obsevanje je del standardnega zdravljenja bolnic z rakom dojk. Odgovor na zdravljenje z obsevanjem je pri vsakem posamezniku drugačen in je odvisen tudi od genetskih dejavnikov. Eden od novejših genetskih označevalcev odgovora na obsevanje je dolžina telomerov. Telomeri ščitijo kromosome pred krajšanjem in vzdržujejo genomsko stabilnost.

Rezultati naše raziskave kažejo, da se dinamika spreminjanja dolžine telomerov takoj po zdravljenju z obsevanjem in v šestih mesecih po obsevanju pri bolnicah z neinvazivnim rakom dojk spreminja in bi lahko služila kot biološki označevalec odgovora na obsevanje. Molekularni mehanizmi, povezani s tem procesom, ostajajo zaenkrat večinoma neraziskani.

Uvod

Rak dojk je najpogostejši rak pri ženskah. Duktalni karcinom *in situ* (DCIS) je neinvazivna oblika raka dojk, ki ga najpogosteje odkrijemo z mamografijo v okviru presejalnih programov (1). Pojavnost DCIS se povečuje in trenutno predstavlja približno 25 % na novo diagnosticiranih rakov dojk in 35 % rakov dojk, odkritih v presejalnih programih (2). Čeprav ima DCIS zelo dobro prognozo, se lahko razvije tudi v invazivno obliko raka dojk, ki lahko pomembno vpliva na preživetje bolnic. Po drugi strani pa pri nekaterih bolnicah bolezen ne bi nikoli napredovala, zato so lahko deležne preveč agresivnega in potencialno nepotrebnega zdravljenja (2).

Standardno zdravljenje DCIS temelji na ohranitveni operaciji dojk in dopolnilnem obsevanju. Obsevanje ne vpliva značilno na preživetje pri DCIS, vendar za 50 % zmanjša število lokalnih ponovitev bolezni, pri čemer se rak v polovici primerov ponovi kot invazivni rak dojk (1-3). Pri velikem deležu bolnic se po obsevanju pojavijo akutni ali pozni neželeni učinki. Akutni neželeni učinki se pojavijo med obsevanjem ali 3 mesece po obsevanju. Večinoma so reverzibilni, a vseeno vplivajo na potek zdravljenja in kakovost življenja. Pozni neželeni učinki se lahko pojavijo več mesecev ali let po obsevanju, so pogosto ireverzibilni ter se s časom stopnjujejo (4). Kljub pomembnemu kliničnemu napredku v diagnostiki in zdravljenju DCIS prilagajanje pooperativnega zdravljenja z obsevanjem posameznim bolnicam z DCIS trenutno še ni mogoče. Novejše raziskave pa so že pokazale, da lahko kombinacija kliničnih in molekularnih parametrov izboljša stratifikacijo bolnic z DCIS (5).

Na molekularni ravni lahko obsevanje neposredno poškoduje različne makromolekule, zlasti DNA. Vpliva na različne procese v celici, na primer na popravljanje napak na DNA in prenos molekularnih signalov ter posledično tudi na celični cikel in apoptozo. Prav tako vpliva na medcelično signalizacijo preko različnih dejavnikov, kot so na primer citokini in nekodirajoče RNA. Nekatere raziskave so že pokazale, da so genetski in epigenetski dejavniki lahko povezani z odzivom tumorja in zdravih tkiv na obsevanje, torej tudi s pojavom neželenih učinkov obsevanja. V naših predhodnih raziskavah so bili tako genetski polimorfizmi v poteh popravljanja napak na DNA in oksidativnega stresa povezani z neželenimi učinki obsevanja na koži in na srcu pri bolnicah z zgodnjim rakom dojke (6,7).

Nov potencialen genetski označevalec odgovora na obsevanje je tudi dolžina telomerov. Telomeri so nukleoproteinski kompleksi na koncih kromosomov, ki ščitijo kromosome pred krajšanjem in vzdržujejo genomsko stabilnost. Z vsako celično delitvijo se telomeri skrajšajo za 20 do 200 baznih parov, kar vodi v celično senescenco ali apoptozo (8). Na krajšanje telomerov lahko vplivajo številni dejavniki, na primer staranje, oksidativni stres, prehrana ter drugi okoljski dejavniki, pa tudi genetski in drugi molekularni dejavniki (9). To krajšanje v določenih celicah upočasnijo telomeraza, ključni encim za vzdrževanje telomerov (10). Spremembe v dolžini telomerov se odražajo tudi v levkocitih v periferni krvi, zato bi dolžina telomerov v levkocitih lahko predstavljala minimalno invaziven biološki označevalec (11).

Telomeri in mehanizmi, vključeni v njihovo vzdrževanje, imajo pomembno vlogo tudi pri nastanku in napredovanju raka (10). Telomerazna aktivnost je na primer v rakavih celicah pogosto povečana (10).

Pri raku dojke je bilo v predhodnih raziskavah ugotovljeno, da je dolžina telomerov povezana z invazivnostjo in stadijem bolezni (12,13). V edini raziskavi, v katero so bile vključene bolnice z DCIS, so v primerjavi z zdravimi kontrolami pri bolnicah opazili krajše telomere v prostocelični DNA v plazmi (14). Vloga dolžine telomerov pa pri raku dojke še vedno ni povsem pojasnjena, saj nedavne raziskave kažejo, da so lahko tako krajši kot daljši telomeri povezani s povečanim tveganjem za nastanek raka (15). Dolžina telomerov bi lahko predstavljala tudi napovedni dejavnik pri različnih oblikah raka, saj so bili krajši telomeri ob diagnozi večinoma povezani s slabšo prognozo, kljub nekaterim razlikam med posameznimi raziskavami (16,17). Žal večina raziskav ni merila dinamike dolžine telomerov, ki bi lahko bila bolj informativna (17). Kljub temu, da so dosedanje raziskave pokazale, da lahko izpostavljenost sevanju tako zmanjša kot poveča dolžino telomerov (9), raziskav, ki bi preučevale vlogo telomerov pri odzivu na obsevanje, še vedno ni. Celice s krajšimi telomeri pred zdravljenjem bi bile lahko bolj občutljive na obsevanje (9,10).

Na dinamiko dolžine telomerov v rakavih celicah vplivajo različni molekularni mehanizmi. Genetske in epigenetske spremembe lahko privedejo do aktivacije prepisovanja katalitične podenote telomeraze (TERT), ki je v normalnih celicah običajno neaktivna (13). Odkritih je bilo več polimorfizmov, povezanih z dolžino telomerov: v genih, ki kodirajo komponente telomeraze (TERT in TERC), ter genih, ki sodelujejo pri vzdrževanju in regulaciji telomerov (npr. RTEL1, TRF1 in TRF2). V genu TERT je bilo opisanih več pogostih potencialno funkcionalnih polimorfizmov posameznih nukleotidov, kot so rs2736098, rs2736100 in rs10069690.

Cilj naše raziskave je bil določiti dinamiko spreminjanja dolžine telomerov v levkocitih pri bolnicah z DCIS, zdravljenih s pooperativnim obsevanjem, in oceniti povezavo genetskih dejavnikov z dolžino telomerov v levkocitih.

Metode

Klinična raziskava

V prospektivno longitudinalno klinično raziskavo smo vključili bolnice z DCIS, zdravljene na Onkološkem inštitutu Ljubljana med letoma 2019 in 2022 v okviru redne klinične prakse z ohranitveno operacijo in pooperativnim obsevanjem. Vse bolnice so v raziskavo privolile prostovoljno in podale pisno soglasje, načrt raziskave pa je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (KME 0120-54/2015-2 (39/05/15) in 0120-54/2015-11). Pri bolnicah smo opravili klinični pregled ter jim odvzeli vzorce za krvne preiskave pred začetkom obsevanja, ob koncu obsevanja ter ob kontrolnem pregledu šest mesecev po obsevanju.

Molekularno-genetske metode

Genomsko DNA smo izolirali iz vzorcev periferne venske krvi, odvzetih pred začetkom obsevanja, po zaključku obsevanja in šest mesecev po zaključku obsevanja s pomočjo komercialnega kompleta reagentov E.Z.N.A. SQ Blood DNA Kit II (Omega Bio-Tek) in v skladu z navodili proizvajalca.

Za določanje dolžine telomerov v levkocitih smo uporabili monokromatsko multipleksno metodo s kvantitativnim PCR (monochrome multiplex quantitative realtime PCR, MMQPCR), ki so jo razvili Cawthon in sodelavci (18). Relativno dolžino telomerov (T/S) smo izrazili kot razmerje med telomernim PCR produktom (T) in količino referenčnega gena za albumin (S) posameznega vzorca.

Za genotipizacijo polimorfizmov TERT rs2736098 (g.6077C > T, p.Ala305=), rs2736100 (g.13647C > A) in rs10069690 (g.20373C > T) smo uporabili kompetitivni alelni specifični PCR (KASP, LGC Genomics).

Statistična analiza

Za opis kategoričnih spremenljivk smo uporabili frekvence, za opis zveznih spremenljivk pa mediano in interkvartilni razpon (25 %-75 %). Ker spremenljivke niso bile normalno porazdeljene, smo za primerjavo dolžine telomerov v različnih časovnih točkah uporabili Friedmanov in Wilcoxonov test za odvisne vzorce. Za primerjavo dolžine telomerov med različnimi skupinami smo uporabili Mann-Whitneyev in Kruskal-Wallisov test za neodvisne vzorce.

Rezultati

V raziskavo je bilo vključenih 89 bolnic z DCIS, zdravljenih z operacijo in pooperativnim obsevanjem. Mediana starost bolnic je bila 56 let (interkvartilni razpon 50 - 63 let).

Relativna dolžina telomerov v levkocitih je bila 0,47 (0,41 - 0,58) pred obsevanjem, 0,72 (0,63 - 0,88) takoj po obsevanju in 0,68 (0,56 - 0,79) 6 mesecev po obsevanju. Takoj po obsevanju se je dolžina telomerov statistično značilno povišala pri 81 (91,0 %) bolnicah

z DCIS ($P < 0,001$). Po šestih mesecih pa se je v primerjavi z vrednostmi po obsevanju dolžina telomerov statistično značilno znižala pri 52 (58,4 %) bolnicah z DCIS ($P = 0,043$). Vrednosti po 6 mesecih so bile pri 69 (77,5 %) bolnic še vedno višje kot pred obsevanjem ($P < 0,001$).

Frekvenca redkejšega alela je bila 27,0 % za rs2736098, 51,7 % za rs2736100 in 21,3 % za rs10069690. Nosilci vsaj enega polimorfnege alela T TERT rs2736098 so imeli statistično značilno višjo relativno dolžino telomerov v levkocitih pred obsevanjem kot nosilci dveh C alelov ($P = 0,020$). Polimorfizma rs2736100 in rs10069690 nista bila povezana z dolžino telomerov (Tabela 1).

Tabela 1. Vpliv polimorfizmov TERT na relativno dolžino telomerov pred obsevanjem pri bolnicah z DCIS.

Polimorfizem	Genotip	Relativna dolžina telomerov	P*
		Mediana (25 % - 75 %)	
rs2736098	CC	0,44 (0,37 - 0,56)	Padd=0,007
	CT	0,52 (0,46 - 0,63)	
	TT	0,45 (0,38 - 0,47)	
	CT+TT	0,51 (0,44 - 0,6)	
rs2736100	CC	0,47 (0,41 - 0,55)	Padd=0,813
	CA	0,48 (0,41 - 0,61)	
	AA	0,49 (0,36 - 0,59)	
	CA+AA	0,48 (0,40 - 0,59)	
rs10069690	CC	0,50 (0,39 - 0,59)	Pdom=0,594
	CT+TT	0,47 (0,41 - 0,55)	

*P: primerjava dolžine telomerov med različnimi genotipi z Mann-Whitneyevim in Kruskal-Wallisovim testom; Padd: P-vrednost za aditivni model, Pdom: P-vrednost za dominantni model

Razprava in zaključek

Rezultati naše raziskave so pokazali, da se relativna dolžina telomerov v levkocitih poveča takoj po zdravljenju z obsevanjem pri večini bolnic z DCIS, a se po šestih mesecih spet delno zmanjša. Podobne rezultate so opazili v manjši raziskavi pri raku prostate, kjer je bila povprečna dolžina telomerov po obsevanju daljša (9). Po treh mesecih pa je bila povprečna dolžina telomerov ponovno blizu vrednosti pred zdravljenjem (9), česar pa v naši raziskavi na raku dojke nismo opazili, saj je bila pri večini bolnic dolžina telomerov še vedno nekoliko daljša. Predvidevajo, da lahko navidezno podaljšanje telomerov po obsevanju vsaj delno pripišemo celični smrti in spremembam v populacijah limfocitov, medtem ko mehanizmi, ki vplivajo na nadaljnje spremembe dolžine telomerov še niso povsem raziskani (9).

V naši pilotni raziskavi je bil pri bolnicah z DCIS, zdravljenih s pooperativnim obsevanjem, TERT rs2736098 značilno povezan z razlikami v dolžini telomerov v levkocitih pred zdravljenjem z obsevanjem. V predhodni raziskavi na raku dojke so prav

tako pokazali, da je rs2736098 povezan z dolžino telomerov (19). V meta-analizah je bil ta polimorfizem povezan tudi s povečanim tveganjem za razvoj kateregakoli raka, vendar z manjšim tveganjem za razvoj raka dojk (20).

Predpostavlja se, da bi lahko bili bolniki ob povečanem deležu celic s krajšimi telomeri po zdravljenju z obsevanjem bolj ogroženi zaradi poznih neželenih učinkov zdravljenja, bolniki z daljšimi telomeri pa bi lahko imeli povečano tveganje za nastanek sekundarnega raka (9). Za natančnejšo pojasnitev pomena dinamike spreminjanja dolžine telomerov po obsevanju in oceno vloge genetskih in drugih molekularnih dejavnikov na dolžino telomerov, so potrebne dodatne prospektivne raziskave.

Zahvala

Zahvaljujemo se vsem sodelavkam in sodelavcem Onkološkega inštituta Ljubljana, Medicinske fakultete v Ljubljani in Univerzitetnega Kliničnega Centra Ljubljana, ki sodelujejo v raziskavi, ter vsem bolnicam, ki so že ali pa še bodo privolile v sodelovanje v raziskavi.

Raziskovalna sredstva: ARRS J3-1753, ARRS J3-2527 in ARRS P3-0321.

Literatura

1. Solin LJ. Management of ductal carcinoma *in situ* (DCIS) of the breast: present approaches and future directions. *Curr Oncol Rep.* 2019;21(4):33.
2. Farante G, Toesca A, Magnoni F, et al. Advances and controversies in management of breast ductal carcinoma *in situ* (DCIS). *Eur J Surg Oncol.* 2022;48(4):736-41.
3. Rudloff U, Jacks LM, Goldberg JI, et al. Nomogram for predicting the risk of local recurrence after breast-conserving surgery for ductal carcinoma *in situ*. *J Clin Oncol.* 2010;28(23):3762-9.
4. De Ruysscher D, Niedermann G, Burnet NG, et al. Radiotherapy toxicity. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):13.
5. Warnberg F, Karlsson P, Holmberg E, et al. Prognostic risk assessment and prediction of radiotherapy benefit for women with ductal carcinoma *in situ* (DCIS) of the Breast, in a Randomized Clinical Trial (SweDCIS). *Cancers.* 2021;13(23).
6. Goricar K, Dugar F, Dolzan V, Marinko T. NBN, RAD51 and XRCC3 polymorphisms as potential predictive biomarkers of adjuvant radiotherapy toxicity in early HER2-positive breast cancer. *Cancers.* 2022;14(18).
7. Marinko T, Stojanov Konda JT, Dolzan V, Goricar K. Genetic variability of antioxidative mechanisms and cardiotoxicity after adjuvant radiotherapy in HER2-positive breast cancer patients. *Dis Markers.* 2020;2020:6645588.
8. Eckburg A, Dein J, Berei J, et al. Oligonucleotides and microRNAs targeting telomerase subunits in cancer therapy. *Cancers.* 2020;12(9).
9. Luxton JJ, McKenna MJ, Lewis AM, et al. Telomere Length Dynamics and Chromosomal Instability for Predicting Individual Radiosensitivity and Risk via Machine Learning. *J Pers Med.* 2021;11(3).

10. Mirjolet C, Boidot R, Saliques S, et al. The role of telomeres in predicting individual radiosensitivity of patients with cancer in the era of personalized radiotherapy. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(4):354-60.
11. Codd V, Nelson CP, Albrecht E, et al. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet.* 2013;45(4):422-7, 7e1-2.
12. Barczak W, Rozwadowska N, Romaniuk A, et al. Telomere length assessment in leukocytes presents potential diagnostic value in patients with breast cancer. *Oncology letters.* 2016;11(3):2305-9.
13. Ceja-Rangel HA, Sanchez-Suarez P, Castellanos-Juarez E, et al. Shorter telomeres and high telomerase activity correlate with a highly aggressive phenotype in breast cancer cell lines. *Tumour Biol.* 2016;37(9):11917-26.
14. Wu X, Tanaka H. Aberrant reduction of telomere repetitive sequences in plasma cell-free DNA for early breast cancer detection. *Oncotarget.* 2015;6(30):29795-807.
15. Dratwa M, Wysoczanska B, Brankiewicz W, et al. Relationship between telomere length, TERT genetic variability and TERT, TP53, SP1, MYC gene co-expression in the clinicopathological profile of breast cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9).
16. Xu J, Chang WS, Tsai CW, et al. Leukocyte telomere length is associated with aggressive prostate cancer in localized prostate cancer patients. *EBioMedicine.* 2020;52:102616.
17. Ennour-Idrissi K, Maunsell E, Diorio C. Telomere Length and Breast Cancer Prognosis: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017; 26(1):3-10.
18. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):e21.
19. Bojesen SE, Pooley KA, Johnatty SE, et al. Multiple independent variants at the TERT locus are associated with telomere length and risks of breast and ovarian cancer. *Nat Genet.* 2013;45(4):371-84, 84e1-2.
20. Zhang X, Chen Y, Yan D, et al. TERT Gene rs2736100 and rs2736098 Polymorphisms are associated with increased cancer risk: a meta-analysis. *Biochem Genet.* 2022;60(1):241-66.

