**Yüksek Doz Metotreksat Alan Akut Lenfoblastik Lösemili Çocuklarda, AANAT Gen Polimorfizmi ve Gen Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması**

**ÖZET**

**Amaç:** Melatonin uyku, sirkadiyan ritim, adrenal bez ve tiroit bezi fonksiyonları, üreme, yaşlanma, antioksidan sistem ve bağışıklık gibi birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynar. Metotreksat 5 g/m²/24 saat infüzyon tedavisi alan Akut Lenfoblastik Lösemili çocuklarda Metotreksat’ın; melatonin seviyesi üzerindeki etkisinin ve melatonin biyosentezinde görev alan AANAT kodlayan genin promotor bölgesinde yer alan -263 G/C değişiminin ve gende belirlenecek diğer olası değişimlerin saptanması bu değişimlerin; AANAT gen ifadelenmesi üzerindeki etkisinin incelenmesidir.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya Lösante Çocuk ve Yetişkin hastanesinde 16 akut lenfoblastik lösemi tanısı almış çocuk hasta dâhil edildi. İlk aşamada olgulardan elde edilen DNA örneklerinde AANAT geni -263 G/C değişimi dizi analizi yöntemi ile incelendi. 5 g/m²/24 saat metotreksat infüzyon öncesi ve sonrası hastalardan RNA izolasyonu yapıldı ve elde edilen RNA örneklerinden Kantitatif Real Time yöntemi ile AANAT geni ifade düzeyleri belirlendi.

**Bulgular:** AANAT geni dizi analizi sonuçlarında -263 G/C promotor bölge değişimi noktasında 3 hasta Homozigot mutant, 12 hasta Heterozigot ve 1 hastada yabanıl genotipe sahip olduğu belirlenmiştir. AANAT gen ifadesinin 5 g/m²/24 saat metotreksat infüzyonu öncesi ve sonrası farklı olduğu belirlenmiştir.

**Sonuç:** Serotonin’in Melatonin’e dönüştürülmesinde rol oynayan AANAT enzimi lösemi tedavisinde kullanılan Metotreksat infüzyonundan etkilenmiştir. Bu çalışmanın hasta sayısı artırılarak ve melatonin sentez mekanizmasında görev alan diğer genler ile birlikte çalışması ve aydınlatılması planlanmıştır.

***Anahtar Sözcükler:*** *Akut lenfoblastik lösemi, melatonin, metotreksat, AANAT*

**Analysis of the Effect of AANAT Gene Polymorphism and Expression in Children Treated with High Dose Metotrexate for Acute Lymphoblastic Leukemia**

**ABSTRACT**

|  |
| --- |
|  |

**Objective:** Melatonin has a role in regulation of many physiological processes such as sleep, circadian rhythm, functions of adrenal and thyroid gland, reproduction, aging, antioxidant system, and immunity. In this study, we aimed to analyze the frequency of -263 C/G polymorphism localized in promoter region of the gene coding AANAT enzyme and its effect to the expression of AANAT gene in pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia patients receiving high dose Methotrexate (5 g/m²/d).

**Material and Method:** Study population consisted of 16 who were admitted to Losante Children and Adult hospital with the diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukemia. Amplification of gene was performed by Polymerase chain reaction and DNA sequencing by sequencer. For RNA isolations, blood samples were collected from patients group before and after therapy. Expression analysis was performed with the relative basic quantification software comes with quantitive Real Time Polymerase chain reaction.

**Results:** In the results of AANAT sequencing, 3 homozygous mutants, 12 heterozygotes and 1 patient wild genotype were determined at -263 G / C promoter region. The AANAT gene expression was determined to be different before and after methotrexate infusion of 5 g / m² / 24 h.

**Conclusion:**The AANAT enzyme which plays a role in converting serotonin to melatonin has been influenced by the methotrexate infusion used in the treatment of leukemia. Further research will be required to determine the genetic bases of melatonin mechanism.

***Key words:*** *Acute lymphoblastic leukemia, melatonin, methotrexate, AANAT*

**GİRİŞ**

Lösemiler çocukluk çağı kanserleri içinde dünyada ve ülkemizde birinci sırayı almaktadır. Çocukluk çağı lösemilerinde geliştirilmiş risk değerlendirmeleri, yeni kemoterapötik ilaçların özellikle de hedefe yönelik ilaçların kullanımı ve destek tedavilerinin iyileştirilmesi sayesinde yaşam yüzdelerinde belirgin bir artış kaydedilmiştir.

Metotreksat (MTK), akut lenfoblastik lösemi (ALL), lenfoma, koriokarsinoma ve bazı solid tümörlerin tedavisinde kemoterapötik olarak, bunun yanı sıra romatoid artrit, psöriasis gibi neoplastik olmayan, kronik hastalıkların tedavisinde sık kullanılan bir ilaçtır. MTK dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek hücrelerdeki tetrahidrofolat düzeylerinin azalmasına neden olan bir folik asit antagonistidir. DNA sentezi için gerekli olan timidilat sentezini engellediğinden malign hastalıkların tedavisinde diğer sitostatik ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır. Vücutta değişik sistemlere toksik etkilerinin yanı sıra kilo kaybı, yorgunluk, grip, baş dönmesi, ateş gibi etkileri de bulunmaktadır (1-3). Aynı zamanda 5 g/m² dozunda 24 saatlik infüzyon MTK tedavisi almakta olan ALL'li çocuklarda infüzyon esnasında ve sonrasında uyku değişiklikleri (uykuya meyil) görülmektedir.

Uyku hormonu olarak bilinen Melatonin (N-asetil–5-metoksitriptamin) uyku, sirkadiyan ritim, adrenal bez ve tiroit bezi fonksiyonları, üreme, yaşlanma, antioksidan sistem ve bağışıklık gibi birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynar. Melatonin epifiz bezinde triptofandan sentezlenir ve plazmada proteinlere bağlıdır. Karaciğerde metabolize olur ve başlıca metaboliti 6-Hidroksimelatoninsülfat (6-OHMS)’dır. İnsanlarda ekzojen melatoninin kısa bir metabolik yarı ömrü (20–60 dakika.), büyük bir hepatik geçiş etkisi vardır. Yetişkinlerde ortalama plazma melatonin seviyesi 60-70 pg/ml ve başlıca metaboliti olan 6-OHMS’nin maksimum plazma konsantrasyonu 80-100pg/ml arasındadır. Çocuklarda serum düzeyi ise yaşa bağımlı olarak değişkenlik göstermektedir. En yüksek melatonin düzeyi yaşamın üç ile beşinci yılları arasında saptanır. Cinsiyetin melatonin salınımı üzerine etkisi yoktur. Plazma melatonin konsantrasyonu gece saat 02:00 ile 04:00 arasında pik değerlerine ulaşır. İnsanda 6-OHMS’nin %70-80’i gece idrarında (24:00-08:00) atılır (4-6).

Melatonin sentez mekanizması döngüsel şekilde çalışmaktadır, günün aydınlanması ile retinadaki reseptörler uyarılır, optik sinir aracılığıyla bu uyarılar suprakiazmatik çekirdekteki (SCN) hücrelere taşınır, bu hücrelerden kalkan baskılayıcı (inhibitör) uyaranlar ise üst servikal gangliyon (SCG) hücrelerinin uyarı üretmesini engeller. Ancak gece ortamın kararmasıyla SCG üzerindeki inhibitör baskı kalkar ve pineal bezi hem α hem de β adrenerjik yolakları ile uyarır. Gelen uyaranlar pineal bezin asıl hücreleri olan pinealositlerde, G proteinleri aracılığıyla N-asetiltransferaz (NAT) enziminin aktif hale geçmesini sağlar. Dolaşımdan hücre içine alınan triptofan, önce 5-hidroksitriptofana, daha sonra da 5-hidroksitriptamine (5-HT, serotonin) dönüştürülür. Serotonin, arilalkilamin N-asetiltransferaz (AANAT) ile N-asetilserotonine (NAS) ve son olarak N-asetilserotonin hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonine (5-metoksi-N-asetiltriptamin) dönüştürülür. Melatonin sentezinde önemli rol oynayan arilalkilamin N-asetiltriptamin ve hidroksiindol-O-metilentranseferaz enzim aktiviteleri gece daha yüksektir. Üretilmiş olan bu melatonin yüksek lipofilik özelliği sayesinde serbest difüzyonla hücre zarını kolayca geçerek tüm vücut sıvılarına hızla dağılır (6,7).

Serotonin’in Melatonin’e dönüştürülmesinde rol oynayan AANAT enzimini kodlayan AANAT geni 17. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuştur ve 4 ekzonludur. Bu genin promotor bölgesinde olan bir polimorfizm, -263 G/C, genin transkripsiyon aktivatör bağlanma bölgesinin yapısını ve promotor bölgenin fonksiyonunu bozmaktadır. Bu polimorfizmin aynı zamanda enzimin serotonin’in asetilasyon kapasitesini azalttığı, dolaylı olarak sentez edilebilir melatonin seviyesini etkilediği bildirilmiştir (8-9).

Bu çalışmanın amacı, yüksek doz MTK (2-5 g/m²/24 saat) infüzyon tedavisi alan ALL’li çocuklarda uygulanan MTK'ın uykuya meyil yapmasındaki olası mekanizmanın ilişkisinin açıklanabilmesi için

1. Melatonin biyosentezinde rol oynayan AANAT geninin promotor bölgesinde yer alan -263 C/G değişimine olan etkisi ve olası diğer mutasyonların tespiti.
2. AANAT geni expresyon analizinin yapılmasıdır.

**GEREÇ VE YÖNTEMLER**

Çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 11.06.2012 tarihli, 10–310–12 karar numarası ile kabul edildi Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerin yasal vâsilerinden çalışmaya katıldıklarına dair onam formları alındı. Çalışma grubumuzu tedavi gören akut lenfoblastik lösemi tanısı almış 1–15 yaş arasında 16 hasta ve aynı yaş grubundan 10 sağlıklı çocuk (kontrol grubu) oluşturdu.

Yüksek doz MTK (5 g/m²/24 saat) infüzyon tedavisi alan uygulaması yapıldı. Hastaların kanlarındaki metotreksat düzeyi ölçümü için hasta serumları ayrıldı ve ölçümü immunassay ile gerçekleştirilmiştir. Referans aralık olarak MTX düzeyi >10µmol/L 24.saat, >1.0µmol/L 48.saat, 0,2 µmol/L 72.saat belirlendi.

DNA izolasyon işlemi MagNa Pure Otomatik İzolasyon sistemi (Roche Diagnostics, Germany) ile gerçekleştirildi. İzole edilen DNA örnekleri AANAT geni 503 baz çiftlik promotor bölgesinin amplifikasyonu; dizayn edilen “forward primer”: 5’-CTCTGCAGGGGGTCAAAA–3’ ve “reverse primer”: 5’ CATCTCTAATCCCCTGCTCTGTCAC–3’ uygun primer çiftleri ile PCR yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. PCR ürünlerinden DNA Dizi Analizi (Beckman Coulter, ABD) yapılmış ve elde edilen sonuçlar CEQ Sequencing Software ile analiz edilmiştir.

Yüksek doz MTK (2-5 g/m²/24 saat) infüzyon tedavisi öncesi ve sonrası şeklinde AANAT geni ekspresyon analizi için hasta ve kontrol grubundan Paxgene Blood toplama tüpüne alınan kan örneklerinden RNA izolasyonu Paxgene Blood RNA izolasyon kiti (PreAnalytix, QİAGEN, Almanya) kiti kullanılarak yapıldı ve izole edilen RNA örneklerinden elde edilen c-DNA lar SYBR Green I Master kit (Roche, Almanya) ve uygun primer çifti ve protokol kullanılarak Kantitatif eşzamanlı Real Time (qRT-PCR) tekniği Light Cycler 480 II cihazı (Roche, Almanya) ve Basic Relative Quantifikasyonu yöntemi ile gen ifade seviyeleri analiz edilmiştir.

**İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizler genel olarak DNA ve RNA boyutunda gerçekleştirildi. DNA boyutunda yapılacak analizlerde, ortaya konulan mutasyonların ve gen değişimlerinin ne kadar risk getirdiğinin saptanması amacıyla Chi-Square istatistiksel analiz metodu kullanılmıştır. Chi-Square tablolarında farklılık var mı sorusunu test ederken %5 yani 0,05 yanılma payı ile çalışılarak anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edilmiştir.

RNA boyutunda yapılacak analizlerde ise ALL grubu için hesaplanacak Ct değerleri referans değer olarak alınmıştır. Amplifikasyon verimliliğinin hesaplaması Real Time-PCR analizinde önemli aşamasıdır. Bağıl kantitasyon ölçümünde bu yöntem örneklerin karşılaştırmalı ifadelenme düzeyinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

**BULGULAR**

Çalışma grubunu oluşturan akut lenfoblastik lösemi tanısı almış 16 hasta (8 kız-8 erkek) ve ortalama yaş 4,25 olarak belirlenmiştir. 3 olgunun remisyon döneminde nüks ettiği, 1 olgunun tedavi aşamasında ex olduğu kaydedilmiştir. Hastaların risk değerlendirilmesine sınıflandırılması yapıldığında 6 olgu yüksek risk, 6 olgu orta risk ve 4 olgu standart risk olarak belirlenmiştir. Hastalara ait tanısal ve demografik bilgiler (Tablo 1) de verilmektedir.

**Tablo 1.**

Hastaların kanlarındaki metotreksat düzeyi ölçümü; 24. saaten sonra yapılan her 6 saat/1 yapılan ölçümlerde 24.,36.,42. ve 48. saatlerde serumdan MTX düzey tespiti yapıldı ve <0,26 µmol/L düzeyinde olması beklendi. 7 hastanın 48. saat, 7 hastanın 66. saat, 1 hastanın 42. saat ve 1 hastanın 54. saat de MTX düzeyinin <0,26 µmol/L olduğu belirlendi.

AANAT geni promotor bölgede bulunan -263 G/C değişiminin genotip dağılımı ve allel frekansları (Tablo 2) de verilmektedir. Çalışmaya dâhil edilen hastaların 3 (%18,75) homozigot mutant, 12 (%75) heterozigot ve 1(%6,25) yabanıl genotipe sahiptir. Kontrol grubunda ise heterozigot 2 (%20), yabanıl genotip 8(%80) belirlenmiştir ( p<0.005).

**Tablo 2.**

Yüksek doz MTK (5 g/m²/24 saat) infüzyon tedavisi öncesi ve sonra AANAT geni ifadesi seviyesi hasta örneklerinde çalışmıştır. AANAT gen ifade düzeyleri infüzyon tedavisi öncesi ve sonrası birbirinden farklılık göstermektedir. 5 g/m²/24 saat infüzyon tedavisi öncesi 1 numaralı hasta dışında diğer hastaların gen ifade düzeyleri kontroller seviyesinde iken, infüzyon tedavisi sonrası AANAT gen ifade düzeyleri özellikle 3,4, 13, 14, 15 ve 16 numaralı hastalar için toplamda 6 hastada (%37,5) AANAT ifadelenme düzeylerinin kontrollere göre yüksek olduğu belirlenmiştir. AANAT gen polimorfizmi açısından bakıldığında bu 6 hastanın AANAT -263 G/C değişimi taşıdıkları belirlenmiştir (Şekil 1-2).

**Şekil 1-2**

Beklenen MTK kan düzeyi µmol/L <0,26 şeklinde sonuç alınmayan 48. saat ve üzeri olan hastalar açısından bulgular ilişkilendirildiğinde; aynı şekilde hastalarında AANAT gen ifade düzeylerinin infüzyon öncesi ve sonrası infüzyon sonrası artmıştır. MTX düzeyinin ancak 66.saatde beklenen değere ulaştığı 4 numaralı hastanın CC homozigot mutant genotip’e sahip olduğu belirlendi.

**TARTIŞMA**

Literatürde, AANAT enziminin fonksiyonu, enzimi kodlayan gen üzerindeki SNP ya da mutasyonlar ile ilişkili çalışmalarda hasta grubu olarak lösemili bireylerin tercih edildiği herhangi bir çalışma ve yine melatonin biyosentezinde önemli rolü olan AANAT enzimini kodlayan gendeki değişim arasındaki ilişkinin ve lösemi tedavisinde anti kanser ajanı olarak kullanılan MTK’nın uyku üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışma yoktur. Bu çalışmada literatürde eksikliği görülen çocukluk çağı lösemili bireylerdeki melatonin sentezi hakkında bilgi sağlayarak, vücudumuzun 24 saatlik zaman dilimini düzenleyen sirkadiyen ritm ile ilgili hastalıklar hakkında ön bilgi verebilecek niteliktedir.

Yapılan çalışmalarda, sağlıklı populasyonda AANAT gen değişimi GC genotipi sıklığı %40-45, CC genotipi sıklığı ise %28 dir (8-11). Bizim çalışmamızda, GC genotipi sıklığı %47, CC genotipi sıklığı ise % 19 olarak belirlenmiştir. -263 G>C promotor bölge değişimi SP1 transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesinde olan bir değişiklik olması nedeni ile AANAT gen ifadelenme kontrolünün bozulmasına neden olabildiği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (8). Kontrol grubu ile hasta grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş, hasta grubunda heterozigot genotip kontrole göre yüksek bulunmuştur, hasta ve kontrol sayısı artırılarak çalışma tekrarlandığında daha güvenilir sonuçlar ortaya çıkabileceği aşikar görünmektedir.

İnfüzyon tedavisi sonrasında melatonin salınım mekanizmasında görev alan ve kandaki melatoninin seviyesini belirleyen AANAT enzimi aktivitesinin infüzyon öncesine göre artmış olduğu çalışmamızın sonuçlarında belirlenmiştir. Bu durum hipotezimizde MTK 5 g/m²/24 saat infüzyonu sonrasında uykuya meyil gözlemlenmesi ile örtüşmesini MTX tedavisinin uykuya meyili destekler nitelikte olduğunu ortaya çıkartmıştır, MTK’nın melatonin metabolizmasında etkisinin olduğunu hastalarımızın %20 si ile paralel olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Promotor bölgede olan bir değişim genin regülasyonunu etkileyerek melatonin üretim seviyesini değiştirebilmekte iken, tek faktör olarak sınırlı kalmamaktadır, bu durum bu yolakta görev alan diğer genler ve çevresel faktörlerde etkileyebilmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile çocuklu çağı lösemisi ile ilgili literatür de ilk defa rapor edilebilecek bulgular ortaya çıkartılmıştır. Bu çalışmada kullanılan metodoloji ile mutasyon ve gen ifade analizlerinin pediatrik ALL gibi löseminin sık görülen bir grubunda gerçekleştirmesi sonucunda elde edilen verilerin daha kapsamlı çalışma ve kontrol grubu ile planlanması sonucunda sirkadiyen ritm ve kanser arasındaki ilişkinin açıklanabileceği çalışmalar için yol gösterici olabilecek nitelikte olduğu görülmektedir.

**KAYNAKLAR**

1. Şentürk N. Metotreksat. Turkderm - Arch Turk Dermatol Venerology 2016;50: 18-21.
2. Kavala M, Türkoğlu Z, Özlü E. Metotreksat ve dermatolojide klinik kullanımları. Göztepe Tıp Dergisi 2014; 29: 104-110.
3. Apak H, Ekici B, Albayram S ve ark. Akut lenfoblastik lösemi tedavisinde düşük dozda metotreksatın beyin komplikasyonlarına etkisi. Türk Ped Arfl 2009; 44: 62-7.
4. Çetin E. Melatonin ve Bağışıklık Sistemi. Erciyes Üniv Vet Fak Dergisi 2015; 2: 119-123.
5. Topal T, Öter Ş, Korkmaz A. Melatonin ve Kanserle İlişkisi. Genel Tıp Dergisi 2009; 19: 3.
6. Brzezinski A.Melatonin in humans, N Engl J Med 1997; 336: 186-95.
7. Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endoc Rev 1991; 12: 151-80 .
8. Ying WG, Lee GCL, Lee DCE. A naturally occurring 263 G/C variant of the human AA-NAT gene and overnight melatonin production. Molecular Genetics and Metabolism. 2001; 81: 65-69.
9. Blömöke B, Golka K, Grifhan B. Aryalkyamine N-Acetyltransferase (AANAT) Genotype as a Personal Trait in Melatonin Synthesis, Journal of Toxicology and Enviromental Health 2008; 7: 874-876.
10. Rabstein S, Harth V, Justenhoven C et al. Polymorphisms in circadian genes, night work and breast cancer: results from the GENICA study. Chronobiol Int. 2014; 31: 115-22.
11. Cazaméa-Catalan D, Magnanou E, Helland R et al. Unique arylalkylamine N-acetyltransferase-2 polymorphism insalmonids and profound variations in thermal stability and catalytic efficiencyconferred by two residues. J Exp Biol. 2013; 15: 216: 1938-48.

***Tablo 1.*** *Çalışma grubu tanısal ve klinik özellikleri*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Hasta** | **Yaş/Cinsiyet** | **Tanı** | **Risk Sınıflandırması** | **-263 G/C Değişimi** | **MTK <0,26** µmol/L |
| 1 | K/ 12 | ALL | Yüksek Risk /Relaps | C/G | 66. saat |
| 2 | E/2 | ALL | Yüksek Risk /Relaps/ Ex | C/G | 48.saat |
| 3 | K/4 | ALL | Standart Risk | C/G | 48. saat |
| 4 | K/3 | ALL | Standart Risk | C/G | 66. saat |
| 5 | K/5 | ALL | Yüksek Risk | C/G | 48. saat |
| 6 | K/1 | ALL | Standart Risk | C/G | 54.saat |
| 7 | E/1 | ALL | Yüksek Risk | C/G | 42.saat |
| 8 | E/5 | ALL | Yüksek Risk /Relaps/ Ex | C/G | 66.saat |
| 9 | E/4 | ALL | Standart Risk | C/C | 66.saat |
| 10 | E/2 | ALL | Standart Risk | G/G | 48.saat |
| 11 | E/3 | ALL | Standart Risk | C/G | 66.saat |
| 12 | E/4 | ALL | Standart Risk | G/G | 66.saat |
| 13 | K/4 | ALL | Standart Risk | C/G | 48.saat |
| 14 | E/10 | ALL | Standart Risk | C/G | 48.saat |
| 15 | K/4 | ALL | Yüksek Risk / Ex | C/G | 48.saat |
| 16 | K/4 | ALL | Standart Risk | C/G | 66.saat |

**Tablo 2.** Çalışma grubu AANAT -263 C/G değişimi genotip dağılımı ve allel frekansı

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Genotip Dağılımı** | | | |  | **Allel Frekansı** | |
| **Hasta** | **GG (%)** | **GC (%)** | **CC(%)** | **P value** | **G** | **C** |
| **AANAT -263 C/G**  **n:10** | 8 (80) | 2(20) | - | 1 | 0,81 | 0,19 |
| **AANAT -263 C/G**  **n:16** | 1 (6,25) | 12 (75) | 3 (18,75) | 0,0004 | 0,41 | 0,59 |

***Şekil 1.*** *MTK 5 g/m²/24 saat infüzyon önce AANAT gen ifadelenmesi*

***Şekil 2.*** *MTK 5 g/m²/24 infüzyon sonrası AANAT gen ifalenmesi*