

Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisinde MTHFR Polimorfizmlerinin Sağkalım Üzerine Etkisi

Effect of the MTHFR Polymorphisms on Survival of Children with Acute Lymphoblastic Leukemia

Özlem ARMAN BİLİR¹, Serap KIRKIZ², Ali FETTAH³, H. Neşe YARALI¹, Bahattin TUNÇ¹,
Namık Yaşar ÖZBEK¹

¹Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Hematoloji – Onkoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

²Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Hematoloji Bölümü, Van, Türkiye

³Dr Sami Ulus Kadın Doğum Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara, Türkiye

Yazı 21-24 Ekim 2015 tarihinde Antalya'da düzenlenen 41. Ulusal Hematoloji Kongresinde poster olarak sunulmuştur.



ÖZET

Amaç: Folat ilişkili genlerin, polimorfizminin akut lenfoblastik lösemiye (ALL) yatkınlığı etkilediği bildirilmiştir. MTHFR geninde tanımlanmış tek nükleotid polimorfizmlerinden (TNP) T677T veya C1298C allelleri vahşi tip allelere göre (C677C ve A1298A) enzim aktivitesinde azalmaya yol açar. MTHFR gen polimorfizmlerinin ayrıca ALL tedavisinde sıklıkla kullanılan antifolat etkili ilaçların metabolizmasını etkileyerek toksisiteyi artırdığı ve böylece sağkalımı etkilediği bildirilmiştir. Çalışmada kliniğimizde izlediğimiz ALL tanılı hastalarımızda MTHFR'nin her iki polimorfizmlerinin sağkalım üzerinde etkisini inceledik.

Gereç ve Yöntemler: B hücreli ALL tanısıyla BFM TRALL 2000 protokolü alan hastaları geriye dönük olarak incelendi. Sekizinci gün mutlak blast sayısı, 15 ve 33. gün kemik iliği verileri yanı sıra MTHFR polimorfizmleri kaydedildi.

Bulgular: Çalışmaya 33 erkek, 23 kız, tanı yaşı ortalama 4.73 yıl olan (en küçük-en büyük 1.3-16.75 yıl) toplam 56 hasta alındı. Bu hastaların prognozu incelendiğinde 5 hastanın relaps olduğunu gördük. Çalışmamızda C677T veya A1298C allelinin farklı kombinasyonlarını taşıyan bireylerin sağkalım ve olaysız sağkalımları arasında ilişki bulunamadı.

Sonuç: Çalışmamızda MTHFR polimorfizmlerinin ALL'li çocuklarda sağkalım üzerine etkisi gösterilememiştir. Daha çok olguyla yapılacak bir çalışmanın daha kesin sonuçlara varmamızı sağlayacağına inanıyoruz.

Anahtar Sözcükler: Akut lenfoblastik lösemi, Çocuk, MTHFR polimorfizmi, Sağkalım

ABSTRACT

Objective: Folic acid-related genes' polymorphisms have been related with a predisposition to acute lymphoblastic leukemia (ALL). Two common polymorphic sites on MTHFR gene; T677T and C1298C may decrease the activity of this enzyme compared to the wild type alleles (C677C and A1298A). The polymorphism may affect the metabolism of antifolate drugs and cause increased drug toxicity and decreased survival. In this study, we evaluated the effect of two frequent polymorphisms on survival of children with ALL.

Material and Methods: We retrospectively evaluated patients who had been diagnosed with B cell ALL and then treated with the BFM TRALL 2000 treatment protocol. We recorded their absolute blast counts at day 8, and bone marrow evaluation at days 15 and 33 as well as MTHFR polymorphisms.

Results: Fifty-six patients [male/female: 33/23, mean age at diagnosis 4.73 years range 1.3-16.75 years] were included in the study. Out of the 56 patients, 5 developed relapse. There was no relationship between different polymorphic alleles of the MTHFR gene with survival and event-free survival.

Conclusion: We did not observe any effect of MTHFR polymorphisms on survival of children with ALL. We believe further studies with a larger group of patients are necessary to draw a firm conclusion.

Key Words: Acute lymphoblastic leukemia, Children, MTHFR polymorphism, Survival

GİRİŞ

Son 40 yıldır tedavi ve destek bakımındaki ilerlemelerle çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemilerinde (ALL) sağ kalım oranları dramatik olarak artmıştır (1). Yaşam oranlarındaki bu artış, hastalıkla ilişkili genetik değişikliklerin yanı sıra hastalığın gidişini etkileyebilecek diğer genetik değişikliklerin daha ayrıntılı incelenmesini gerekli kılmıştır (2,3). Kemoterapötiklerin metabolizmasını etkileyen enzimlerin genetik farklılıklarının relaps ve toksisite riskinin belirlenmesinde rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. Bu bağlamda folat ilişkili genlerin polimorfizminin ALL'ye yakınlığı etkilediği bildirilmiştir (4). Geçmişte yapılan çalışmalarda folat eksikliğinin DNA replikasyonu sırasında dUMP'nin hatalı birleşmesine, DNA kırıklarına, translokasyon ve delesyonlara neden olduğu gösterilmiştir. Ek olarak DNA hipometilasyonunun protoonkogenlerin aktivasyonunu ve ekspresyonunu artırdığı ve bunun sonucunda kanser riskinin arttığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (5). Metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), folik asit siklusunda 5,10-metilen tetrahidrofolatın metil tetrahidrofolat'a dönüşümünü katalizler. Akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılan ana ilaçlardan biri olan metotreksat bu dönüşümü inhibe eder. Metilen tetrahidrofolat redüktaz geninde iki adet tek nükleotid polimorfizmi (TNP) tanımlanmıştır; C677T ve A1298C. Bu genin 677. pozisyonunda T ve/veya 1298. pozisyonunda C nükleotidi taşıması vahşi tip allellere (sırasıyla C ve A) göre enzim aktivitesinde azalmaya yol açar. Bu durumun ALL tedavisinde sıklıkla kullanılan metotreksat gibi antifolat etkili kemoterapötik ilaçların metabolizmasını etkileyerek kemoterapi toksisitesini ve relaps riskini artırdığı ve böylece sağkalımı etkilediği bildirilmiştir (6,7). Çalışmamızda ALL tanılı hastalarımızda MTHFR geninin her iki polimorfizminin (C677T ve A1298C) sağkalım üzerine etkisini inceledik.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Hastanemizde 2009-2012 tarihlerinde B hücreli ALL tanısıyla izlenmiş ve BFM-TRALL 2000 tedavi protokolü almış hastaların kayıtları geriye dönük olarak incelendi. Hastalar BFM-TRALL 2000 tedavi protokolünde belirlenen kriterlere göre risk gruplarına ayrıldı. BFM-TRALL 2000 tedavisi uyarınca konsolidasyon tedavisinde hastalara 2 hafta aralıklarla toplam 4 doz metotreksat tedavisi verildi. Metotreksat dozu standart risk grubundaki hastalara 1 g/m², orta risk grubundaki hastalara 5 g/m² olarak verildi. Yüksek risk grubundaki hastalara ise konsolidasyon tedavisinde 6 kür yüksek risk kemoterapi bloğu verildi ve bunların dördünde 5 g/m² dozunda metotreksat tedavisi verildi. Metilen tetrahidrofolat redüktaz polimorfizmleri real time PCR yöntemiyle çalışıldı (8).

BFM-TRALL 2000 protokolu gereğince hastaların 8. gün mutlak blast sayısı, 15 ve 33. gün remisyon durumları kaydedildikten sonra MTHFR polimorfizminin sağkalıma etkisi araştırıldı. Hastaların 80 aylık sağkalım sürelerine bakıldı.

Çalışma için 25.03.2014 tarihinde 2014/029 protokol numarası ile etik kurul onayı alınmıştır. Tüm hastaların yasal sorumlularından hasta onam formu alınmıştır.

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 16.0 (Statistical Package for Social Sciences for Windows Version 16.0) paket programı kullanıldı. Hastaların MTHFR polimorfizmleri ile 8. gün mutlak blast sayısı (MBS), 15. ve 33. gün Kİ remisyon durumları ve sağkalıma etkisi ki-kare analizi ile değerlendirildi. P <0.05 olması anlamlı kabul edildi. Sağkalım eğrileri Kaplan Meier analizi ile oluşturuldu.

SONUÇLAR

Çalışmaya toplam 56 hasta [33 erkek, 23 kız, tanı yaşı ortalama 4.73 yıl (1.3-16.75 yıl)] alındı. Hastalarımız en kısa 31 ay, en uzun 72 ay, median 51 ay izlendi. 22 hasta standart, 27 hasta orta, 7 hasta yüksek risk grubundaydı (Tablo I). Tedavi sırasında 5 hastada relaps gelişti (tanıdan sonra ortalama 27.4 ay sonra), ölen hastamız olmadı. Metilen tetrahidrofolat redüktaz polimorfizmleri ve risk gruplarına göre hasta dağılımı Tablo II'de özetlenmiştir. Metilen tetrahidrofolat redüktaz 1298. pozisyonuna bakıldığında, hastaların %46.4'ünün A/A, %23'ünün A/C ve %12.5'inin C/C alleli taşıdığı izlendi. Metilen tetrahidrofolat redüktaz 677 pozisyonunda ise hastaların %50'sinin C/C, %46.4'ünün C/T, %3.6'sinin T/T allelleri taşıdığı görüldü. Çalışmamızda 80 aylık olaysız sağkalım oranı % 91.1 olarak bulundu. Hastalarımızın MTHFR polimorfizmleri ve sağkalım oranları Şekil 2 ve 3 te özetlenmiştir. Metilen tetrahidrofolat redüktaz A1298C ve MTHFR C677T allelleriyle sağkalım arasında ilişki bulunmadı (p>0.05).

Hastalarımızdan 2 tanesi 677. pozisyonda T/T allelleri, 7 tanesi ise 1298. pozisyonda C/C allelleri taşıymaktaydı. Bu hastaların prognozu incelendiğinde hiçbirinin relaps olmadığı izlendi. Relaps olan hastalarımızın allelik dağılımı incelendiğinde ise 2 hastamızın normal allel, 2 hastamızın 1298. pozisyonda A/C, 1 hastamızın ise 1298. pozisyonda A/C alleli ve 677. pozisyonda C/T alleli taşımakta olduğu izlendi.

TARTIŞMA

Son zamanlarda MTHFR polimorfizmlerinin çocukluk çağı ALL'sinin prognozuna etkisi konusunda araştırmalar yapılmış, bazı çalışmalarda ilişki bulunurken bazılarında bu ilişki saptanamamıştır (6,9-12). Metilen tetrafolat redüktaz polimorfizmleri ALL tedavisinde sıklıkla kullanılan metotreksat gibi antifolat etkili kemoterapötik ilaçların metabolizmasını etkileyebilmektedir (13). Bu enzim ayrıca metotreksat klirensinde önemli rol oynamaktadır (7,14). Metotrexat, ALL tedavisinin konsolidasyon ve özellikle idame tedavisinde sık kullanılan standart bir ilaçtır. Metilen tetrahidrofolat redüktaz 677. pozisyonunda CT alleli taşıyan bireylerde MTHFR aktivitesi %30 azalırken, TT alleli

taşıyanlarda bu aktivite % 60 oranında azalmakta, bu azalma bireylerde metotreksat toksisitesinin artışına neden olabilmektedir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda CT polimorfizminin prognostik önemi toksisite ile ilişkilendirilmiştir. Ulrich ve ark. (15) kronik miyeloid lösemi tanısıyla allojenik kemik iliği nakli yapılan ve metotreksat verilen 220 hastada MTHFR C677T varyant taşıyanlarda oral mukozit insidansının arttığını göstermişlerdir. Diğer taraftan Aplenc ve ark. (16) yaptıkları çalışmada MTHFR 677 pozisyonunda C/T olmasıyla metotrexate toksisitesi arasında ilişki bulunmamıştır. Bu farklı sonuçlar için çeşitli olası açıklamalar öne sürülmüştür. Bunlardan birisi MTHFR C677T alellinin yaptığı etkinin methotrexat dozu, tedavi şeması, birlikte kullanılan ilaçlar, folat durumu, diyet veya diğer çevresel faktörler ile değişebiliyor olmasıdır (16). Yang ve ark. (7) yaptığı

bir metaanalizde C677T polimorfizmi taşıyan ALL hastalarında metotreksat ilişkili karaciğer toksisitesi, miyelosupresyon, oral mukozit, gastrointestinal ve cilt toksisitesinin relatif riskinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu toksisiteler bazen hayatı tehdit edici olabilir ve metotreksat tedavisinin modifikasyonunu ya da kesilmesini gerektirebilir. Lopez-Lopez ve ark. (17) yaptığı bir çalışmada ise C677T polimorfizminin metotreksat toksisitesi ile ilişkisi gösterilememiştir.

Metotreksatın terapötik etkinliğinin azalması diğer taraftan relaps riskini de artırmaktadır. Metilen tetrahidrofolat redüktaz C677T polimorfizminin relaps riskini artırdığı Children's Cancer Group (CCG)'nun 557 ALL hastasında yaptığı bir çalışmada gösterilmiştir (16). Ojha ve ark. (18) yaptıkları bir metaanalizde

Tablo I: Risk gruplarına göre hasta özeti.

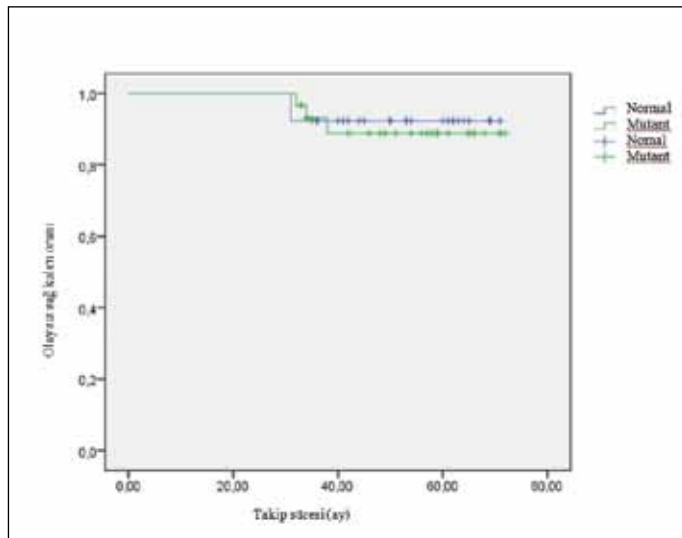
	8. Gün MBS		15. Gün KİA		33.Gün KİA	
	<1000	>1000	Remisyon	Remisyonunda Değil	Remisyonunda	Remisyonunda Değil
SRG	22	0	16	6	22	0
MRG	27	0	19	8	27	0
HRG	2	5	3	4	5	2

MBS: Mutlak blast sayısı, **KİA:** kemik iliği aspirasyonu, **SRG:** Düşük risk grubu, **MRG:** Orta risk grubu, **HRG:** Yüksek risk grubu.

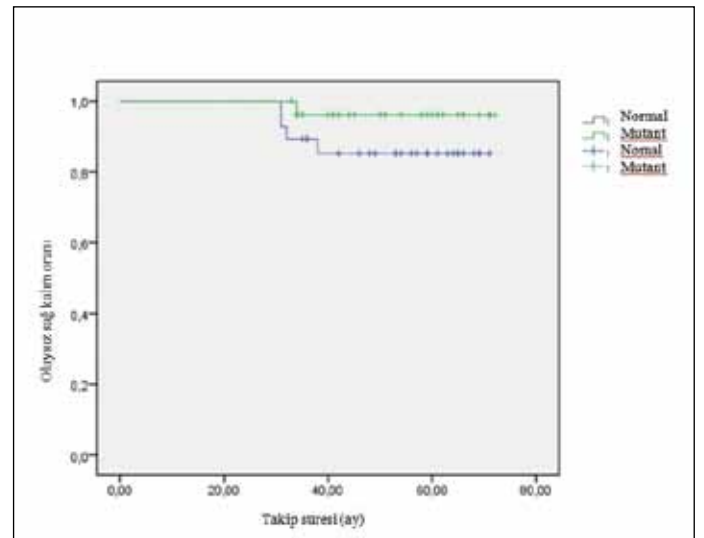
Tablo II: Hastaların risk gruplarına göre MTHFR polimorfizm durumları.

MTHFR		8. Gün MBS		15. Gün KİA		33.Gün KİA	
		<1000	>1000	Remisyonunda	Remisyonunda Değil	Remisyonunda	Remisyonunda Değil
A1298C	NORMAL	22	4	18	8	24	2
	MUTANT	29	1	20	10	29	1
C677T	NORMAL	27	1	22	6	27	1
	MUTANT	24	4	16	12	26	1

MBS: Mutlak blast sayısı, **KİA:** kemik iliği aspirasyonu.



Şekil 1: MTHFR A1298C polimorfizmine göre sağkalım oranları.



Şekil 2: MTHFR C677T polimorfizmine göre sağkalım oranları.

MTHFR C677T alleli taşıyan bireylerde ALL mortalite riskini daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. de Deus ve ark. (12) yaptığı çalışmada, Metilen tetrahidrofolat redüktaz 677TT alleli taşıyanların sağkalımı MTHFR 677CC alleli taşıyanlara göre daha iyi olduğu, 1298AC ve 677CC alleli taşıyanların ölüm sıklığının daha yüksek olduğunu saptamışlar, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulamamışlardır. Karas Kuzelicki ve ark. (19) ve Sepe ve ark. (14) yaptıkları çalışmalarda düşük enzim aktivitesine neden olan MTHFR genotipleri ile relaps sıklığının azaldığı ve relapsız sağ kalım oranının arttığı ilişkisini göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda C677T veya A1298C allelinin farklı kombinasyonlarını taşıyan bireylerde sağkalım ve olaysız sağkalım arasında istatistiksel fark bulunmadı. Çalışmamızdaki hasta sayısının az olması ve takip sürelerinin kısa olması nedeniyle sonuçlarımız gerçeği yansıtmıyor olabilir. Bu nedenle daha fazla hasta sayısı ve daha uzun takip süresi ile çalışmanın yeniden düzenlenmesini önermekteyiz.

Bu çalışma için Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi etik kurulundan 25.03.2014 tarihinde 2014/029 protokol numarası ile etik kurul onayı alınmıştır.

KAYNAKLAR

- Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: Where are we going and how do we get there? *Blood* 2012;120:1165-74.
- Mackall CL. In search of targeted therapies for childhood cancer. *Front Oncol* 2011;1:18.
- Aplenc R, Lange B. Pharmacogenetic determinants of outcome in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2004;125:421-34.
- Barbosa CG, Souza CL, Neto JPM, Arruda MGB, Barreto JH, Reis MG, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in myeloid leukemia patients from Northeastern Brazil. *Genet Mol Biol* 2008;31:29-32.
- de Jonge R, Tissing WJ, Hooijberg JH, Jansen G, Kaspers GJ, Lindemans J, et al. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009;113:2284-9.
- Hider SL, Bruce IN, Thomson W. The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:1520-4.
- Yang L, Hu X, Xu L. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on methotrexate-induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis. *Tumour Biol* 2012;33:1445-54.
- Agarwal RP, Peters SM, Shemirani M, von Ahnen N. Improved real-time multiplex polymerase chain reaction detection of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T and 1298A>C polymorphisms using nearest neighbor model-based probe design. *J Mol Diagn* 2007;9:345-50.
- Damnjanovic T, Milicevic R, Novkovic T, Jovicic O, Bunjevacki V, Jekic B, et al. Association between the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia in Serbian children. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010;32:e148-50.
- Chan JY, Ugrasena DG, Lum DW, Lu Y, Yeoh AE. Xenobiotic and folate pathway gene polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia in Javanese children. *Hematol Oncol* 2011;29:116-23.
- Kamel AM, Moussa HS, Ebid GT, Bu RR, Bhatia KG. Synergistic effect of methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphism as risk modifiers of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Egypt Natl Cancer Inst* 2007;19:96-105.
- de Deus DM, de Lima EL, Seabra Silva RM, Leite EP, Cartaxo Muniz MT. Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T, A1298C, and G80A Polymorphisms on the Survival of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leuk Res Treatment* 2012;2012:292043.
- Kim YI. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and pharmacogenetics: A new role of single nucleotide polymorphisms in the folate metabolic pathway in human health and disease. *Nutr Rev* 2005;63:398-407.
- Sepe DM, McWilliams T, Chen J, Kershenbaum A, Zhao H, La M, et al. Germline genetic variation and treatment response on CCG-1891. *Pediatr Blood Cancer* 2012;58:695-700.
- Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, et al. Pharmacogenetics of methotrexate: Toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 2001;98:231-4.
- Aplenc R, Thompson J, Han P, La M, Zhao H, Lange B, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2005;65:2482-7.
- Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J, Garcia-Orad A. A systematic review and meta-analysis of MTHFR polymorphisms in methotrexate toxicity prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J* 2013;13:498-506.
- Ojha RP, Gurney JG. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and overall survival in pediatric acute lymphoblastic leukemia: A systematic review. *Leuk Lymphoma* 2014;55:67-73.
- Karas Kuzelicki N, Milek M, Jazbec J, Mlinaric-Rascan I. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) low activity genotypes reduce the risk of relapse-related acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk Res* 2009;33:1344-8.