

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ ÇOCUKLARDA
KEMOTERAPİ İLİŞKİLİ ENZİMLERDEKİ
GEN POLİMORFİZM SIKLIĞI VE
PROGNOZA ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. BURCU YAZICIOĞLU**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. ZÜHRE KAYA**

**ANKARA
MAYIS 2014**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ ÇOCUKLARDA
KEMOTERAPİ İLİŞKİLİ ENZİMLERDEKİ
GEN POLİMORFİZM SIKLIĞI VE
PROGNOZA ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. BURCU YAZICIOĞLU**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. ZÜHRE KAYA**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2011-31 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
MAYIS 2014**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca değerli tecrübelerini bizlere aktaran ve bu süreçte büyük emekleri olan Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Aynur Oğuz'a,

Tezimin değerlendirilmesinde ve yine eğitim sürecimdeki emekleri için Çocuk Hematoloji Bilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Türkiz Gürsel'e,

Her konudaki desteği, önerileri, tüm aşamalardaki emekleri ve rehberliği için tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Zühre Kaya'ya,

Eğitimimde büyük katkıları olan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarım ve yardımcı personellere,

Çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda görevli Sezen Güntekin Ergün'e,

İyi günde ve kötü günde hep yanımda olan ve her zaman desteklerini hissettiğim canım aileme ve eşim Op. Dr. Ömer Yazıcıoğlu'na,

Teşekkür eder, sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Varlığıyla daha doğmadan en büyük destekçim olan Oğlum'a...

Dr. Burcu Yazıcıoğlu (Özer)

Mayıs 2014

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tanım	3
2.2. Sıklık	3
2.3. Etyoloji.....	3
2.3.1. Genetik Faktörler	4
2.3.2. Çevresel Faktörler	5
2.4. Patogenez	7
2.5. Sınıflandırma.....	8
2.5.1. Morfolojik Sınıflandırma	8
2.5.2. Histokimyasal Boyama	8
2.5.3. İmmunolojik Sınıflandırma.....	9
2.6. Klinik Bulgular	9
2.7. Laboratuar Bulguları	9
2.8. Risk Grupları.....	10
2.9. Prognoz	11
2.10. Tedavi.....	11
2.11. Komplikasyonlar	12
2.12. Gen Polimorfizmleri ve Farmakogenetik.....	13
2.12.1. Metotreksat (MTX)	16
2.12.2. Glukokortikoidler	18
2.12.3. Siklofosfamid	19

2.12.4. Antrasiklinler	19
2.12.5. Etoposid	20
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Yöntemler	23
3.1.1. Genetik Analiz	23
3.1.2. Çoğaltılmış DNA'ların Jel Elektroforezde Değerlendirilmesi	25
3.2. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
4.1. Gen Polimorfizm Sıklığı	31
4.2. Kemoterapi İlişkili Enzimlerdeki Gen Polimorfizmi Tipine Göre Kemoterapi Etkinlik ve Toksisite Değerlendirilmesi	35
4.2.1. MTRR, TS, MTHFR C677T, MTHFR A1298C Gen Polimorfizmleri	35
4.2.2. GSTM1, GSTT1 Gen Polimorfizmleri	43
4.3. Prognoz ve Yaşam Süreleri	47
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR	64
7. ÖZET	67
8. SUMMARY	69
9. KAYNAKLAR	71
10. EKLER	81
Ek 1. ALL BFM 95 protokol I tedavi şeması	81
Ek 2. ALL BFM 95 protokol M tedavi şeması	81
Ek 3. ALL BFM 95 protokol II tedavi şeması	81
Ek 4. ALL BFM 95 idame tedavi şeması*	82
Ek 5. Dünya Sağlık Örgütü Toksisite Kriterleri-1	83
Ek 6. Dünya Sağlık Örgütü Toksisite Kriterleri-2	84
11. ÖZGEÇMİŞ	85

KISALTMALAR

ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut myeloblastik lösemi
BFM	: Berlin-Frankfurt-Münster
TS	: Timidilat Sentaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
MTRR	: Metionin Sentaz Redüktaz
GST	: Glutasyon S-Transferaz
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz
MS	: Metionin Sentaz
MTX	: Metotreksat
FAB	: French-American-British
CD	: Cluster of Differentiation
SR	: Standart Risk
MR	: Orta Risk
HR	: Yüksek Risk
CCG	: Children Cancer Group
SSS	: Santral Sinir Sistemi
THF	: Tetrahidrofolat
USG	: Ultrasonografi
b.ç.	: Baz Çifti
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EFS	: Olaysız Sağ Kalım
KML	: Kronik Myeloid Lösemi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1.	Folat metabolizma yolları.....	15
Şekil 2.	MTRR gen polimorfizmine göre olaysız sağ kalım (EFS) değerlendirilmesi.....	47
Şekil 3.	TS gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesi	48
Şekil 4.	GSTM gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesi	49
Şekil 5.	GSTT gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesi	50
Şekil 6.	MTHFR C677T gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesi.....	51
Şekil 7.	MTHFR A1298C gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesi.....	52

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1.	Lösemi tiplerine göre sık görülen mutasyonlar	4
Tablo 2.	B ve T hücre yüzey belirleyici antijenik yapıları.....	9
Tablo 3.	Risk gruplarının belirlenmesi	10
Tablo 4.	Hastaların demografik verileri	30
Tablo 5.	Çalışmaya alınan hastalarda polimorfizm sıklığının hastaların genel ve risk gruplarına göre dağılımı	31
Tablo 6.	Relaps ve ağır (evre III-IV) toksisite olan hastalarda polimorfik gen sıklıkları	33
Tablo 7.	Hastaların gen polimorfizm sıklığının ağır (evre III-IV) toksisite tipine göre dağılımı	34
Tablo 8.	Metotreksat kan düzeylerinin MTRR GG gen polimorfizmi varlığına göre karşılaştırılması	36
Tablo 9.	Metotreksat kan düzeylerinin TS 3R/3R gen polimorfizmi varlığına göre karşılaştırılması	36
Tablo 10.	Metotreksat kan düzeylerinin TS (3R/3R) ve MTRR (GG) kombine gen polimorfizmi varlığına göre karşılaştırılması.....	37
Tablo 11.	Metotreksat kan düzeylerinin MTHFR C677T TT polimorfizmi varlığına göre karşılaştırılması	37
Tablo 12.	Metotreksat kan düzeylerinin MTHFR A1298C CC polimorfizmi varlığına göre karşılaştırılması	38
Tablo 13.	Protokol M öncesi Hb, BK, ANS, Platelet, AST, ALT, Bilirubin düzeylerinin DSÖ toksisite kriterlerine göre	

	evrelendirilmesi ve TS, MTRR, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmlerine göre dağılımı.....	38
Tablo 14.	Protokol M sonu Hb, BK, ANS, Platelet, AST, ALT, Bilirubin düzeylerinin DSÖ toksisite kriterlerine göre evrelendirilmesi ve TS, MTRR, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmlerine göre dağılımı.....	40
Tablo 15.	Protokol I sonu Hb, BK, ANS, Platelet, AST, ALT, T.bilirubin düzeylerinin DSÖ toksisite kriterlerine göre evrelendirilmesi ve TS, MTRR, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmlerine göre dağılımı.....	41
Tablo 16.	Protokol II sonu Hb, BK, ANS, Platelet, AST, ALT, T.bilirubin düzeylerinin DSÖ toksisite kriterlerine göre evrelendirilmesi ve TS, MTRR, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmlerine göre dağılımı.....	42
Tablo 17.	GSTM1 ve GSTT1 mutasyonu olan hastalarda antrasiklin, siklofosfamid tedavisi öncesi ve sonrası tam kan sayım değerlerinin karşılaştırılması	44
Tablo 18.	GSTM1 ve GSTT1 mutasyonu olan hastalarda antrasiklin, siklofosfamid tedavisi öncesi ve sonrası kan biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması	46
Tablo 19.	Gen polimorfizm tiplerinde protokolü tamamlama süreleri	53

1. GİRİŞ

Çocukluk çağında en sık görülen maliyn hastalık akut lenfoblastik lösemi (ALL)'dir (1). Günümüzde yoğun kombine kemoterapi protokolleri ile tedavi başarısı %70-80'lere ulaşmasına karşın hastaların % 20-30'unda relaps veya daha ender olarak tedaviye direnç görülmektedir (1,2). Uzun yıllar içinde geliştirilmiş ve halen de optimize edilmekte olan ALL Berlin-Frankfurt-Münster (BFM)-95 tedavi protokolünde tedavi yoğunluğu risk faktörlerine göre değişmektedir. Bu yönden en önemli risk faktörleri yaş, tanıdaki lökosit sayısı, lösemik hücre immün fenotipi ve t(4;11), t(9;22) gibi genetik translokasyonların varlığıdır. Bunun yanında kemoterapötik ilaçların metabolizmasında rol alan bazı kritik proteinleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin (tek aminoasit değişiklikleri) de tedavinin etkinliğinde önemli rol oynadıklarına ilişkin bilgiler giderek artmaktadır.

Gen polimorfizmlerinin sıklığı ırklar arasında farklılık göstermekte ve enzim tipine bağlı olarak %5-50 arasında değişmektedir (3-5). Türkiye'de sağlıklı popülasyonda Timidilat Sentaz (TS) polimorfizmlerinden 2R/2R %17.6, 2R/3R %48.8, 3R/3R %33.6 oranında bulunmuştur. TS 3R/3R alleli Türk popülasyonunda diğer beyaz ırklarla aynı, Japon ve Çin popülasyonuna göre ise daha az sıklıkta bulunmuştur (4). Glutasyon S-transferaz (GSTT1) anlamsız (null) genotip polimorfizm sıklığı sağlıklı Türk popülasyonunda %20 olarak bulunmuştur (5).

Timidilat sentaz, Metionin Sentaz Redüktaz (MTRR), Glutasyon S-Transferaz (GST) ve Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimlerinde saptanan gen polimorfizmlerinin akut lösemilerde relaps veya rezistans gelişimine

neden olduğu veya önlediğine ilişkin değişik araştırmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir (3,6-12).

Biz bu çalışmada ALL’li ocuklarda TS, GST, MTRR polimorfizmleri ile MTHFR C677T ve A1298C genlerinde polimorfizm sıklığını belirlemeyi; TS, MTHFR ve MTRR’nin metotreksat (MTX) tedavisi sırasında ölülen kan düzeyleri ile ilişkisini ve GST’nin siklofosfamid toksisitesi ve bu genlerdeki polimorfizmlerin lösemi prognozu ile bağlantısını incelemeyi planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Lösemiler, kemik iliğindeki multipotent hücrelerin maliyn transformasyonu sonucunda hematopoezin belli bir farklılaşma evresinde duraklaması ve sınırsız çoğalarak anormal hücre klonunu oluşturması ile karakterize bir hastalıktır. Tanısı kemik iliği incelemesinde bu anormal klonun %25'in üstünde saptanması ile konulmaktadır (13-15).

2.2. Sıklık

Çocukluk çağında tüm yeni tanı kanser olgularının % 25-30'unu lösemiler oluşturmaktadır (1). Çocuklarda akut lösemilerin yaklaşık %75-80'ini ALL, geri kalanını AML (akut myeloblastik lösemi) oluşturmaktadır. Lösemi insidansı ırka, coğrafi bölgeye göre değişebilmektedir. Gelişmiş ülkelerde ALL en sık 2-3 yaş arasındaki çocuklarda görülmekte olup son 30 yılda % 20'lik bir kümülatif artış dikkati çekmektedir. Akut myeloblastik lösemi ise ilk 2 yaşta ve adölesan döneminde sık görülmektedir (1,2). Ülkemizde ise Türk pediatrik onkoloji grubu, çocuklarda yeni tanı kanser olguları içinde lösemilerin ilk sırada yer aldığını ve %31 sıklıkta olduğunu bildirmiştir (16).

2.3. Etyoloji

Lösemi multifaktöriyel bir hastalıktır. Etyolojide temel olarak genetik ve çevresel faktörlerin rolü vardır (1,15,17).

2.3.1. Genetik Faktörler

Edinsel genetik değişiklikler: Akut lösemilerin % 80'inde lösemik klonda edinsel kromozom değişiklikleri saptanır, normal klonda bu genetik bozukluk görülmez.

a.Sayısal değişiklikler: Hiperdiploidi (>50 kromozom) iyi prognoz, hipodiploidi (< 45 kromozom) ise kötü prognoz ile ilişkilidir.

b.Yapısal değişiklikler: Translokasyonlar, delesyonlar, inversiyonlar, gen amplifikasyonları ve nokta mutasyonlarıdır (Tablo 1). Bunlar içinde translokasyonlar %80 sıklıkta görülmektedir. Kromozom değişiklikleri sonucu translokasyona bağlı bir proto-onkogen aktive olur veya delesyona bağlı bir tümör baskılayıcı gen kaybolur.

Tablo 1. Lösemi tiplerine göre sık görülen mutasyonlar

Lösemi tipi	Genetik mutasyon	Onkogen
Pre B-ALL	t(1;19)	PBX-E2A
ALL-AML	t(4;11)(11q 23)	MLL
ALL-AML	t(9;22)	ABL/BCR
OLGUN B-ALL	t(8;14)	MYC
T-ALL	t(8;14)	MYC

Kalitsal hastalıklar: Down sendromu (risk 20-600 kat), Bloom sendromu, Fanconi aplastik anemisi, Kostmann sendromu, Li-fraumeni sendromu, Ataksi telenjiiektazi, Nörofibromatozis, Poland sendromunda lösemi sıklığı normal popülasyona göre artmıştır.

2.3.2. Çevresel Faktörler

İlaç ve kimyasallar:

•Topoizomeraz II inhibitörleri: Topoizomeraz II enzimi DNA çift sarmalındaki kırılma ve tekrar bağlanmaları katalize eden bir enzim olup hücre içinde replikasyon, transkripsiyon ve paketlenme gibi reaksiyonlarda görev alarak çift sarmal DNA yapısının oluşmasını sağlar. Ancak topoizomeraz II'yi inhibe eden kanser ilaçları, antibiyotikler, sebze ve meyve ekstraktları, meşrubatlar, hormonal ilaçlar ve östrojenler gibi faktörlerin etkisi ile DNA çift sarmalında oluşan kırıklar tekrar bağlanamayacağından normal çift sarmal DNA yapısı oluşamaz ve hücrelerin büyük bir kısmı apoptozise giderken geride kalan az sayıdaki hücre bozuk DNA içeriği ile ileride lökomogeneze neden olur. Bu nedenle lösemi tedavisinde kullanılan topoizomeraz II inhibitörlerinin ileride farklı lösemi tipleri geliştirme riski vardır. Bu sıkıntılı durum karşısında son yıllarda araştırmalar çoğunlukla genetiği bozulmuş hücrelerin etkin dozda uygulanacak ilaçlarla tümüyle ortadan kaldırılmasını hedeflemektedir. Bunun için de kişilere özel değişken gen polimorfizmlerinin bilinmesinin ilaç dozu ayarlanmasında çok büyük katkısı olacağı bildirilmektedir. Topoizomeraz II inhibitörleri;

- ✓ Kanser kemoterapötikleri: Etoposid (etoposid), akrininler (amsakrin), antrasiklinler (doksorubisin, daunorubisin), bis-piperazinedionlar (razoksan ICRF 193)
- ✓ Kinolon türevi antibiyotikler,

- ✓ Flavonoidler (meyve ve sebze ekstralarında bulunan quercetin maddesi),
- ✓ Benzen (organik çözücüler),
- ✓ Katekinler (meşrubatlar; çay, kakao, şarap),
- ✓ Sentetik östrojenler

• Alkilleyici ajanlar: Antrasiklinler gibi Topoizomera II inhibitörleri ile eş zamanlı uygulanan direkt sitotoksik etkili siklofosfamid ve alkilleyici ajanlar, topoizomera II inhibitörlerinin genotoksik potansiyelini arttırmaları. Bunlar da benzer şekilde lösemik ve sağlıklı hücrelerin apoptozisini arttırırken geride kalan az sayıdaki hücrenin ileride karsinogeneze yol açabilmektedirler.

• Alkol, sigara: Özellikle hamilelik dönemi boyunca gebelerin az miktarda da olsa alkol, sigara, keyif verici madde tüketmeleri, pestisid ve benzene (solven, petrol) maruz kalmaları sonucunda bebeklerinde 11q23/MLL gen yeniden düzenlenmesiyle infant lösemisi gelişebilmektedir (17).

Radyasyon:

• İyonizan radyasyon: 1945’de Nagasaki ve Hiroşima’ya atılan atom bombasından sonra akut lösemi sıklığındaki artış nedeniyle iyonizan radyasyonun rolü daha iyi anlaşılmalı başlanmıştır. Bunun üzerine yapılan çalışmalarda özellikle gebelik döneminde 1-10cGy radyasyona maruziyetin çocukluk çağı akut lösemisini 1.4 kat arttırdığı bulunmuştur. Sonuç olarak yıllık ortalama ~ 1mSv iyonize radyasyonun düşük doz gibi gözükmesine karşılık lösemi sıklığında %5 oranında artışa yol açabilecek bir doz olduğu bildirilmiştir (17).

- Noniyonizan radyasyon: Lösemi etyolojisindeki rolü tam kanıtlanmamış olmakla birlikte; noniyonizan radyasyon elektrikli cihazlar, baz istasyonları ve yüksek enerji nakil hatlarından yayılan elektromanyetik alanlardır (17).

Enfeksiyonlar: Çocukluk çağı ALL'sinin 1-5 yaşında sık görülmesi erken çocukluk çağında geçirilen viral enfeksiyonla bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir. Bunlar; HTLV-1, retroviruslar (RNA virüsü) ve EBV (DNA virüsü)'dir. Ayrıca enfeksiyöz patojenlere (EBV, CMV, Hemofilus influenza) geç maruziyetin immun sistemin organizasyonunda bozulmaya örneğin; T lenfosit alt tiplerinin supresyonuna, eliminasyonuna veya ekspansiyonuna yol açarak maliyn klonun gelişimine neden olduğu bildirilmektedir. Diğer yandan mikrobiyal antijenle kemik iliğindeki lenfoid kök hücrelerin proliferatif stresle indüklenmesinde potansiyel immunolojik mekanizmaların ve sitokinlerin sorumlu olduğu değişik araştırmalarda bulunmuştur (17).

2.4. Patogenezi

Lösemi hücre çoğalması ve olgunlaşmasını kontrol eden genetik mekanizmada ortaya çıkan mutasyonlar veya çevresel etkenlere bağlı olarak gelişir. Bu çevresel ve genetik değişiklikler sonucu hücre çoğalmaya devam ettiği halde olgunlaşamaz ve sonuçta lösemik hücre oluşur (18).

Sürekli bölünme özelliği kazanmış lösemik blastlar kemik iliğini doldurur ve normal hücrelerin gelişmesine engel olur. Kemik iliğindeki blast oranı toplam hücrelerin %60'ını aştığında klinik belirtiler görülmeye başlar. Bunlar; anemi,

trombositopeni, lökopeni, lökositoza baēlı gelişen halsizlik, solukluk, çabuk yorulma, kanamalar, enfeksiyonlar ve kemik ağrılarıdır.

Lösemik blastların organ infiltrasyonu sebebiyle hepatomegali, splenomegali, lenfadenomegali izlenir. Ayrıca santral sinir sistemi, kemik, akciēer, karaciēer, gastrointestinal sistem ve ürogenital sistemde de infiltrasyona baēlı semptomlar görülür (13-15).

2.5. Sınıflandırma

Lösemilerin ayırıcı tanısı morfolojik, immunfenotipik ve genetik yöntemlerle yapılır (13-15,19-21).

2.5.1. Morfolojik Sınıflandırma

French-American-British (FAB) kriterlerine göre çocukluk çaēı ALL'si L1, L2, L3 olarak sınıflandırılmıştır. Hücre boyutu, çekirdek ve çekirdekçiēin özellikleri, çekirdek/sitoplazma oranı, sitoplazmik bazofili ve vakuol varlığına göre morfolojik deēerlendirme yapılır.

2.5.2. Histokimyasal Boyama

Miyeloperoksidaz, Sudan siyahı, Asit fosfataz, Periodik Asit Schiff, Nonspesifik esteraz, Terminal deoksinükleotidil transferaz boyaları morfolojik olarak sınıflandırılan FAB kriterlerini destekleme amaçlı kullanılır.

2.5.3. İmmunolojik Sınıflandırma

İmmünfloresans ve akım sitometrisi yöntemleri kullanılır. Lösemik blastın cinsini ve gelişim aşamasını membranında bulunan protein yapısındaki antijenik yapılara (CD-Cluster of Differentiation) ve /veya sitoplazmasındaki enzimlere göre belirleme yöntemidir (Tablo 2).

Tablo 2. B ve T hücre yüzey belirleyici antijenik yapıları

B hücreli için	CD79a, CD19, CD22, cIG, sIG
T hücreli için	cCD3, CD7, CD2 /CD5, CD1a

2.6. Klinik Bulgular

Klinik bulgular kemik iliği infiltrasyonuna veya organ infiltrasyonuna bağlı olarak gelişir. Anemiye bağlı halsizlik, solukluk, çabuk yorulma, taşikardi; trombositopeniye bağlı peteşi, ekimoz, mukozal kanamalar ve nötropeniye bağlı enfeksiyonlar görülür.

Ayrıca hepatosplenomegali, lenfadenopati, kemik ağrısı, testislerde büyüme ve sertlik, santral sinir sistemi (SSS) tutulum bulguları (konvülzyon, fasial paralizi) gibi organ infiltrasyon bulguları muayenede tespit edilir. T hücreli lösemilerde hayatı tehdit eden klinik bulgular daha çok mediastinal kitle ve vena kava süperior sendromu şeklinde görülür (13,14).

2.7. Laboratuvar Bulguları

Tam kan sayımında oluşan bozukluklar her vaka için değişkendir. Sıklıkla normokrom normositer anemi görülmekle birlikte lökosit sayısı; normal (4000–10.000/mm³), azalmış (<4000/mm³) ve artmış (>10.000/mm³) olabilir. Ancak

mutlak nötrofil sayısı ve trombosit sayısı çoğunlukla azalmıştır. Periferik kan yaymasında blast görülebilir veya görülmeyebilir. Kemik iliği aspirasyonu tanıda altın standarttır. Lösemi tanısı için kemik iliğinde blast oranı $> \%25$ olmalıdır (13,14).

2.8. Risk Grupları

Hastalar başvuru anındaki klinik, laboratuvar bulguları, sitogenetik özellikleri ve tedavi yanıtlarına göre risk gruplarına ayrılmaktadır. ALL BFM-95 protokolüne göre risk grupları Tablo 3'te tanımlanmıştır (22).

Tablo 3. Risk gruplarının belirlenmesi

Standart Risk (SR)	Orta Risk (MR)	Yüksek risk (HR)
❖ 7 günlük prednizon tedavisinden sonraki 8. günde periferik kanda lösemik hücre sayısı $< 1000/\mu\text{L}$, ❖ Lökositler $< 20.000/\mu\text{L}$ ve $1 \leq \text{yaş} < 6$ ❖ 33. günde tam remisyon mevcut ❖ t (9;22) (BCR/ABL rekombinasyonu) yok ❖ t (4;11) (MLL/AF4 rekombinasyonu) yok ❖ T immunolojisi dışı	❖ 7 günlük prednizon tedavisinden sonraki 8. günde periferik kanda lösemik hücre sayısı $< 1000/\mu\text{L}$, ❖ 33. günde tam remisyon mevcut ❖ t (9;22) (BCR/ABL rekombinasyonu) yok ❖ t (4;11) (MLL/AF4 rekombinasyonu) yok	❖ Tedavinin 8. gününde periferik kanda lösemik hücre sayısı $\geq 1000/\mu\text{L}$, ❖ 33. günde tam remisyon elde edilememiş ❖ t (9;22) (BCR/ABL rekombinasyonu) mevcut ❖ t (4;11) (MLL/AF4 rekombinasyonu) mevcut
<u>6 kriterin tümüne birden uymalı</u>	<u>4 kriterin tümüne birden uymalı, ayrıca aşağıdaki kriterlerden en az 1'i mevcut olmalı:</u>	<u>Yaş ve lokosit sayısından bağımsız olarak her bir kriterin tek başına varlığı yüksek risk grubunda yer almak için yeterlidir</u>
	❖ Lökosit sayısı $\geq 20.000/\mu\text{L}$ ❖ Yaş < 1 ❖ Yaş ≥ 6	

2.9. Prognoz

Risk gruplarını belirleyen yaş, lökosit sayısı, immunfenotip, sitogenetik, tedavi yanıtı ve ek olarak cinsiyet, kromozom sayısı, SSS tutulumu, minimal rezidüel hastalıktır. Risk gruplarına uygun olarak seçilen tedavi protokolleri ile ALL’li çocuklarda 5 yıllık sağkalım %70-80 arasında değişmektedir (22,23). Akut lenfoblastik lösemi BFM-90 alan 2178 hastada 6 yıllık olaysız sağkalım standart risk grubunda %85, orta risk grubunda %82, yüksek risk grubunda %34 saptanmıştır (23). Kliniğimizde 140 hastada yapılan bir çalışmada ise olaysız sağ kalımlar 6 yılda; standart risk grubu için %90, orta risk grubu için %79, yüksek risk grubu için %58 ve 12 yılda; standart risk için %86, orta risk için %73, yüksek risk için %41 olarak bulunmuştur (22).

2.10. Tedavi

Tedavide hedef erken dönemde en yüksek oranda lösemik hücre ölümünü sağlayabilmektir. Günümüzde uygulanan protokoller (BFM, St. Jude’s, Dana Farber, Children Cancer Group-CCG) yoğun ve yüksek oranda ilaçtan oluşarak bunu başarmışlardır. Protokoller arası fikir birliği en çok B-ALL tedavisi üzerinedir. Tüm modern tedavi şemaları 5 ana bölüm içermektedir (2,13,14,23-25).

1. Blastların hızla ortadan kaldırılması ile remisyonun indüksiyonu
2. Rezidiüel lösemiye ortadan kaldırarak ve SSS lösemisini eradike ederek konsolidasyon

3. Özellikle yüksek riskli hastalarda rezistan, rezidüel blastların ortadan kalkması ile intensifikasyon
4. Remisyonun idame edilmesi
5. Protokolün yanı sıra destekleyici tedavi (Transfüzyon, antibiyotikler)

ALL tedavisinde kullanılan temel ilaçlar kortikosteroidler, alkilleyici ajanlar, vinka alkaloidleri, antimetabolitler, antrasiklinler ve L-asparajinazdır. Çoklu ilaç kullanımında hedef ilaç direncinin önlenbilmesidir.

2.11. Komplikasyonlar

ALL’li hastalarda morbilite ve mortalitenin önemli nedeni uygulanan kemoterapotik ilaçlardır (13,14,26). İlaça bağlı nedenler içinde steroid ilk sırada yer alıp en sık kullanılan steroidler; prednisolon ve deksametazondur. Steroidlerin akut dönemde kullanımında hiperglisemi, hipertansiyon gibi yan etkiler görülürken; uzun süreli kullanımında büyüme geriliği, obezite, osteoporoz, katarakt gibi komplikasyonlar geliştiği bildirilmiştir.

Antrasiklinler grubunda daunorubisin ve doksorubisin kardiyotoksik ilaçlar olup akut dönemde ritm bozuklukları, uzun dönemde 550 mg/m^2 kümülatif doz aşıldığında kardiyomiyopati gibi komplikasyonlar izlenmektedir.

Metotreksat, purinetol, tioguanin gibi antimetabolitler ile karaciğer fonksiyon bozuklukları görülmektedir. Uzun süreli kullanımı ile karaciğer fibrozisi gelişebilmektedir. Ayrıca yüksek doz metotreksat sonrası renal bozukluklar ve ensefalopati geliştiği bildirilmektedir. Yüksek doz metotreksat

infüzyonu esnasında düzey kontrolü ve etkin lökovorin uygulamaları ile bu akut komplikasyonlar önlenmektedir.

Alkilleyici ajan olan siklofosfamid akut dönemde hemorajik sistite, uzun dönemde de pansitopeniye yol açmaktadır. Akut komplikasyonun önlenmesi için hidrasyon ve mesna infüzyonları uygulanır.

Vinka alkaloidleri uygunsuz ADH sendromu ve periferik nöropatiye yol açabilir.

L-asparajinaz ise hipersensitivite, hiperglisemi, pankreatit, hipoalbuminemi, hipofibrinojenemi gibi yan etkilere neden olmaktadır.

Ayrıca radyoterapi uygulamaları da hastalarda akut ve kronik dönemde komplikasyonlara neden olmaktadır. Radyoterapi her vakaya uygulanmaz. Tanı anında SSS ve testis tutulumu olan T-ALL’li olgulara ve yüksek riskli olgulara radyoterapi uygulanır. Akut dönemde başağrısı, yanıklar; kronik dönemde de büyüme geriliği, obezite, üreme fonksiyon bozukluğu görülebilir.

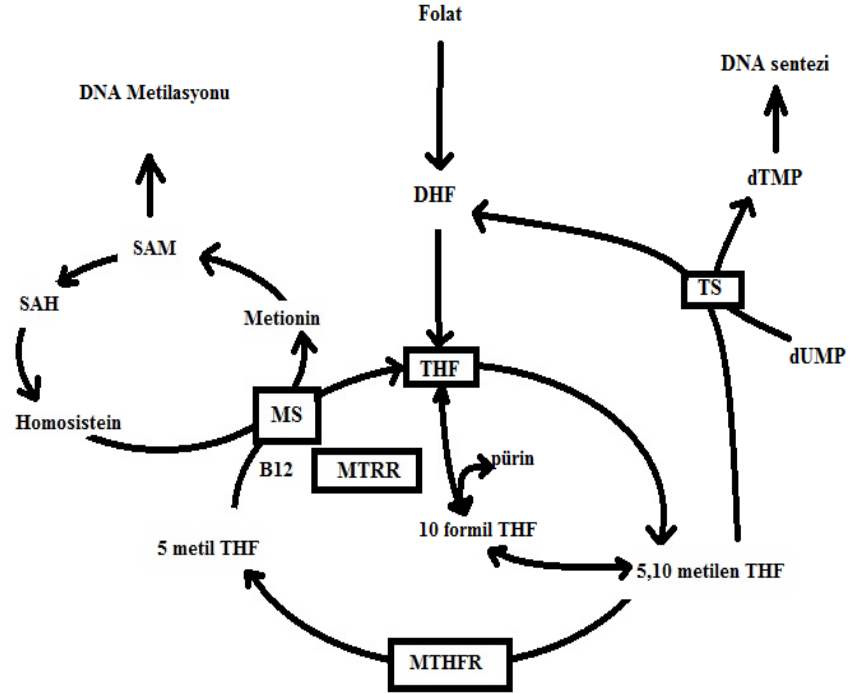
2.12. Gen Polimorfizmleri ve Farmakogenetik

Çocukluk çağı ALL’inde günümüzde yoğun kombine kemoterapötik ilaçların kullanımı ve etkin destek tedavisi ile uzun süreli hastalıksız yaşam oranı %70-80’lere ulaşmıştır. Buna karşılık %20-30 olguda halen relaps ve tedavi direnci önemli bir sorundur. Son yıllarda, antilösemik ilaçların farmakodinamiğinde rol alan proteinleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin tedavinin etkinliği üzerinde önemli rolleri olabileceğine işaret eden çok sayıda araştırma yayınlanmıştır (3,6-12).

Antilösemik ilaçlar etki mekanizmalarına göre sınıflandırılır. Bu ilaçlar içinde lösemi tedavisinde kullanılan başlıca alkilleyici ajanlar; siklofosamid ve ifosfamidir. Alkilleyici ajanlar hücre döngüsünün en çok G1 ve S döneminde etkilidirler. Tüm alkilleyici ajanlar DNA ile kovalent bağlar oluşturarak DNA kırılmalarına yol açarlar. Bu ajanlar DNA yapısı bozulan hücrenin apoptoza gitmesini sağlayarak etki gösterirler. Diğer antilösemik ilaçlar içinde antimetabolit ilaçlardan metotreksat, 6-merkaptopurin, tioguanin, sitarabin lösemi tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Bu ajanlar DNA sentezinde rol oynayan purin ve pirimidin yolağındaki enzimlerin yapısını veya fonksiyonunu etkileyerek DNA hasarına yol açarlar. Antimetabolitler etkisini hücrenin S fazında gösterirler ve ilaca maruz kalma süresi ile bağlantılı olarak toksisite dereceleri artmaktadır. Bir diğer grup vinka alkaloidleri (vinkristin, vinblastin) ve bitkisel kaynaklı ilaçlardır (etoposid). Vinka alkaloidleri mitozun metafaz döneminde mitoz içciklerinin oluşmasını engelleyerek hücre bölünmesini durdurur. Bitkisel kaynaklı ilaçlar da hücre siklusunu G2 ve geç S fazında durdurarak DNA hasarına yol açarlar. Sitotoksik antibiyotiklerden en bilineni antrasiklinlerdir (daunorubisin, doksorubisin). Antrasiklinler döneme özgü ilaçlar olmamakla beraber S döneminde etkinlikleri daha fazladır. Diğer kemoterapötik ajanlar içerisinde L-asparajinaz lösemi tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olup etkinliğini G1 döneminde göstermektedir (27).

Bu ilaçlar vücudumuzdan iki yolla metabolize edilmektedirler. Faz 1 ilaç metabolizmasında; ilaçlar metabolitleri aracılığıyla hidroliz, oksidasyon ve redüksiyon basamakları ile inaktif ilaca çevrilerek atılırlar. Faz 2 ilaç

metabolizmasında ise; ilaçlar metabolitleri kullanmadan glukuronizasyon, asetilasyon, s-metilasyon, glutasyon ve sulfo-konjugasyon yolu ile direkt inaktif ilaca çevrilerek atılırlar (28). Bu ilaçlardan alkilleyici ajanlar, bitkisel kaynaklı ilaçlar ve steroidler GST enzimi tarafından okside edilirler. Antimetabolitlerin metabolizması ise folat metabolizma yollarında rol alan TS, MTHFR ve MTRR enzim yapılarındaki değişikliklerden etkilenir.



Şekil 1. Folat metabolizma yolları (11)

Folatlar dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimi tarafından aktif formları olan dihidrofolat ve tetrahidrofolata (THF) çevrilir. Bu folat yolağının sürekliliğini sağlayan enzimlerinden birisi de TS'dir (29). Timidilat sentaz deoksiuridin monofosfatı deoksitimidin monofosfata katalize ederek DNA sentezini sağlar. Bu reaksiyon için 5,10-metilen-THF gereklidir. Metilen

tetrahidrofolat redüktaz enzimi 5,10-metilen-THF'ı 5-metil-THF'a çevirir. 5-metil THF de metionin sentezinde kullanılır. Folat yolağının devamlılığını sağlayan metionin sentaz (MS) enzimi metionin sentaz redüktaz (MTRR) kofaktörü aracılığı ile homosisteinin metionine dönüşümünde rol alır (Şekil 1) (11). Glutasyon S-transferazlar birçok glutasyon bağımlı reaksiyonda görev alır. En önemlisi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu olup peroksidaz ve izomeraz enzimleri olarak da görev yaparlar (30).

2.12.1. Metotreksat (MTX)

Lösemi tedavisinin esas ilacı olan metotreksat bir folat inhibitörü olup, aktif poliglutamat formları dihidrofolat redüktaz ve timidilat sentaz enzimlerini inaktive ederek DNA veya RNA sentezinin inhibisyonuna yol açmaktadır. Metoreksatın önemli yan etkileri olması ve bunların hastalar arasında farklılık göstermesi dikkatleri metabolizmasında yer alan enzimlerin polimorfik varyantlarına yöneltmiştir.

Metilentetrahidrofolat redüktaz C677T'nin CC varyantı yabanıl tip olup normal popülasyonda görülmektedir. CT varyantı heterozigot, TT varyantı ise homozigot formudur. MTHFR A1298C AA varyantı yabanıl tip olup normal popülasyonda görülmektedir. AC varyantı heterozigot, CC varyantı ise homozigot formudur. Özellikle MTHFR C677T enziminin CT ve TT varyantları artmış metotreksat düzeyi ile; MTHFR A1298C enziminin AC ve CC varyantları ise artmış metotreksat düzeyi ve evre III/IV anemi, trombositopeni, artmış AST düzeyleri ve daha sık nötropenik ateş atakları ile ilişkili bulunmuştur (9,31).

Ayrıca MTHFR C677T enziminin TT varyantı artmış relaps riski ile ilişkili bulunmuştur (9).

DNA sentezinden sorumlu TS geninde saptanan 2R/2R varyantı yabanıl tip olup normal popülasyonda görülmektedir. Timidilat sentaz enziminin 2R/3R varyantı heterozigot, 3R/3R varyantı ise homozigot formudur. Timidilat sentaz enziminin 3R/3R şeklindeki polimorfizminde, 2R/3R veya 2R/2R genotiplerine göre enzim aktivitesi daha yüksek olduğu için MTX etkisi azalmakta veya ilaç direnci artmaktadır. Bu durumun löseminin prognozunu olumsuz etkilediği ve uzun süre olaysız yaşam süresinin yabanıl tip hastalara göre daha kısa olduğu bildirilmiştir (6,12,32,33).

DNA metilasyonundan sorumlu MTRR A66G gen polimorfizmi de metilasyon yolağının düzgün çalışmamasına, DNA hipometilasyon ya da dismetilasyonuna yol açarak hücrenin karsinogenezis riskini arttırmaktadır. Metionin sentaz redüktaz A66G'nin AA varyantı yabanıl tip olup normal popülasyonda görülmektedir. Metionin sentaz redüktaz enzimin AG varyantı heterozigot, GG varyantı ise homozigot formudur. Metionin sentaz redüktaz AG, GG genotipleri yabanıl tipe göre lösemili çocuklarda artmış mukozit ile ilişkili bulunmuştur (29). Metionin sentaz redüktaz, metionin sentaz enziminin aktif kofaktörü olup, MTRR'de polimorfizm varlığı homosisteinin remetilasyonunu önleyerek artışına, eş zamanlı metil-THF'de artışa ve folat seviyesinde düşüklüğe yol açarak ALL riskinde artışa neden olduğu bildirilmektedir (34).

Timidilat sentaz 2R/2R veya 2R/3R ve MTHFR C677T allelini taşıyanlarda ALL riskinde 1.4 katlık azalma saptanmıştır. Aynı çalışmada MTRR

66 AG varyantı ALL riski ile ilişkisiz bulunmuştur (10). Başka bir çalışmada ise kombine MTHFR 677 CT/TT, MS 2756 AG/GG ve MTRR 66 AG/GG genotipi taşıyanlarda ALL riskinde azalma saptanmıştır (11). Ayrıca MTHFR 1298 AC varyantı veya MTRR 66 GG alleleline sahip hastalarda azalmış invitro MTX duyarlılığı bildirilmiştir (34).

2.12.2. Glukokortikoidler

Glukokortikoidler, ALL indüksiyon tedavisinin 4 ana ilacından biridir. Tedavinin 8. gününe kadar yalnız glukokortikoid verilerek blast azalması değerlendirilir. Periferik kandaki blast sayısının 1000/ μ L altında olması iyi prognoz için çok değerli bir faktördür. Steroide iyi yanıtılarda sağkalım >%70 iken, steroidde yanıtı olmayan hastaların olumsuz sağkalımları <%40 saptanmıştır (23,35).

Glukokortikoidler hücre içine glukokortikoid reseptörlerine bağlanarak pasif olarak girip, özellikle lenfosit ve lenfoblastlarda nükleusta transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynayarak hücre döngüsünde arrest ve apoptozise neden olurlar. Glukokortikoidler yüksek polimorfik genlerden GST ve CYP3A ile metabolize olurlar (36). ALL tedavisi alan çocuklarda steroidde yanıtın, GSTT1'in 0/0 homozigot (delesyon) varyantına sahip olanlarda GSTT1 A/0 heterozigot varyantı veya A/A yabanıl tipine sahip olanlara göre daha iyi olduğu bildirilmiştir (35).

2.12.3. Siklofosfamid

Siklofosfamid, ALL tedavisinde kullanılan önemli bir alkilleyici ajandır. Karaciğerde sitokrom p450 enzim sistemine bağlı olarak çalışan aldehid dehidrogenazlar ve glutatyon S-transferazlar aracılığı ile metabolize edilir (30,37). Bu enzimlerin çeşitli polimorfizmler gösterdiği ve siklofosfamid içeren tedavilerde hastada değişen derecelerde etkinliğe ve yan etkiye yol açtıkları bildirilmektedir (38,39). Glutatyon S-transferaz'ın en sık rastlanan varyantları T ve M'dir. Bunlarda T varyantı 2 tip polimorfik allel, M varyantı 5 tip polimorfik allel taşımaktadır. M1 tipi karaciğerde, M2-M5 tipleri ekstrahepatik (beyin, intestinal, testis) dokularda bulunmaktadır. Bu tipler içinde en sık rastlanan polimorfik alleller M1 ve T1'dir (38). Bu alleller anlamsız (null) genotipi olan ve olmayan olarak sınıflandırılmaktadır.

Glutatyon S-transferaz M1 ve T1 varyantlarının anlamsız genotip sıklığı Afro-Amerikalı lösemili çocuklarda sağlıklı siyah çocuklara göre yüksek bulunmuştur (40). Sağlıklı Türk popülasyonunda GSTT1 anlamsız genotip sıklığı %20 olarak bildirilmiştir (5).

2.12.4. Antrasiklinler

Daunorubisin ve doksorubisin antrasiklin türevi antibiyotiklerdir. Glutatyon S-transferaz enzimi ile metabolize olurlar. Doza bağımlı kardiyotoksisite en önemli yan etkilerindendir.

Rituksimab, siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin ve prednizolon kemoterapisi (R-CHOP) alan diffüz büyük B hücreli lenfomalı 94 hastada GSTT1

anlamsız genotipi taşıyanlarda evre III/IV kemoterapi ilişkili toksisite, lökopeni, ateş ve mukozit izlenmiştir. Ayrıca GSTM1/T1 çift anlamsız genotip taşıyanlarda evre III/IV trombositopeni bulunmuştur. Bu toksisiteler GST enzimi ile metabolize olan siklofosfamid, glukokortikoid ve doksorubisin kullanımına bağlanmıştır (39).

2.12.5. Etoposid

Etoposid, bir topoizomeraaz II inhibitörü olup metabolizmasında birçok enzimin yanı sıra GST enzimleri de görev almaktadır (3,41,42). Etoposid dağılımı ile ilgili lösemili hastalarda yapılmış bir araştırmada GST enzim varyantları içinde GSTP1 AA genotipi ve CYP3A5 AA genotipi taşıyan 109 Afro-Amerikalı ALL’li çocukta düşük ilaç klirensi bulunmuştur (42).

Biz de bu araştırmada ALL’li çocuklarda ilaç farmakodinamiğini etkileyen TS, MTRR, MTHFR ve GST enzimlerinin gen polimorfizm sıklığını belirleyip; TS, MTHFR ve MTRR’nin metotreksat tedavisi sırasında ölçülen kan düzeyleri ve GST’nin siklofosfamid toksisite ile ilişkisini değerlendirip, bu genlerdeki polimorfizmlerinin lösemi prognozu ile bağlantısını inceledik.

3. MATERİYAL VE METOD

Bu çalışmaya 1998-2014 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'nda ALL BFM-95 protokolü ile tedavi edilen yaşları 0-18 arasında 67 erkek, 39 kız toplam 106 lösemili hasta dahil edildi (5 hasta dış merkezden allogeneik kök hücre nakli amacıyla sevk edilmişti). Çalışma öncesinde etik kurul izni (Sayı:070/13.04.2011) ve ailelerin bilgilendirilmiş onamı alındı. Bu çalışma üniversitemiz bilimsel araştırmalar projesi birimi (BAP) tarafından desteklendi (Sayı:01/2011-31, BAP).

Akut lenfoblastik lösemi tanısı kemik iliğinin wright boyalı preparatlarının ışık mikroskopuyla incelemesi ile konulduktan sonra sitogenetik ve immunfenotipik incelemelerle hastalığın tipleri ve risk grupları belirlendi. Tüm hastalar başvuru sırasında tam kan sayımları, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, elektrolitler, serum immunglobulinler, HCV, HBV, HIV, CMV ve EBV serolojisi, akciğer grafisi ve abdominal ultrasonografi (USG) ile değerlendirildi. Çalışmaya alınan 106 hastanın 29'u standart risk (SR), 61'i orta risk (MR), 16'sı yüksek risk (HR) grubunda olup; standart, orta ve yüksek risk ALL BFM-95 kemoterapi protokolüne göre tedavi edildiler. Standart ve orta risk grubundaki hastalar için kullanılan protokolde indüksiyon, güçlendirme ve idame tedavileri benzer olup farklılık yüksek risk grubunda indüksiyon sonrası blok tedavilerinden kaynaklanmaktaydı. Protokollerini tamamlayan tüm hastalar güçlendirme tedavisinde metotreksatı 5 g/m² dozda 4 kez (toplam 20 g/m²) ve idame tedavisinde 6-merkaptopurini günlük 50mg/m² ve metotreksatı 20mg/m² dozda 80 hafta boyunca ağızdan almışlardı. Standart ve orta risk grubundaki hastalar

indüksiyon tedavisinde siklofosfamidi 1 g/m² dozda 3 kez (toplam 3 g/m²), yüksek risk grubundaki hastalar ise blok tedavilerinde 200mg/m² dozda 10 kez (toplam 2g/m²) ve ifosfamidi 800mg/m² dozda 10 kez (toplam 8g/m²) almışlardı (Ek 1-4).

Tüm hastaların dosyaları geriye dönük taranarak Dünya Sağlık Örgütü toksisite kriterlerine (Ek 5,6) göre hematolojik, biyokimyasal, enfeksiyon toksisiteleri yönünden değerlendirildi. Toksisite kriterlerine göre yoğun tedavi protokolü sırasında tedavi kesimi gerektiren veya idame tedavi sonrası izlemde ileri evre (evre III ve IV) toksisite gelişen olgular toksisite grubu olarak değerlendirildi. Yüksek doz metotreksat etkinliğinin değerlendirilmesinde metotreksat kan düzeyleri infüzyonun 24. saat, 36. saat, 42. saat ve 48. saatinde ölçüldü. BFM-95 protokolüne göre etkin metotreksat düzeyleri 24. saat için ≤150 µmol/l, 36. saat için ≤3 µmol/l, 42. saat için ≤1 µmol/l, 48. saat için ≤0,4 µmol/l kabul edildi. Normal aralığın dışında metotreksat düzeyi olan ve ek doz lökovorin tedavileri gereken olgular da ayrı bir grup olarak değerlendirildi. Hastaların sağkalım durumları; son görüldüğü tarih, ölüm tarihi, relaps tarihi olarak kaydedildi. Relaps olan olgular ayrı bir grup olarak değerlendirmeye alındı.

Metotreksat etkinlik ve toksisitesinin değerlendirilmesinde TS, MTHFR C677T, A1298C ve MTRR gen polimorfizmleri; siklofosfamid etkinlik ve toksisitesinin değerlendirilmesinde ise GST gen polimorfizmleri incelendi. Bunun için hastaların hematoloji poliklinik kontrolleri sırasında lösemi hastalığı ile ilgili rutin kanları alınırken bu testler için de kan alınıp Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile hastanemiz Tıbbi Genetik laboratuvarında çalıştırıldı. Tüm

hastalarda TS, MTRR ve GST gen polimorfizmleri çalışılmasına karşılık MTHFR gen polimorfizm sonuçları dosyaları geriye dönük taranan 106 hastanın sadece 43'ünde mevcuttu.

3.1. Yöntemler

Çalışmaya alınan hastaların rutin kan kontrolleri yapılırken 5ml kan EDTA'lı tüpe ayrılmış ve Gazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında incelenmiştir. Çalışmada 5-metiltetrahidrofolat-homosistein metiltransferaz redüktaz (MTRR), glutatyon S-transferaz mu 1 (GSTM1), glutatyon S-transferaz theta 1 (GSTT1), timidilat sentaz (TS) genleri analiz edilmiştir. İnternal kontrol olarak hemoglobin beta (HBB) geni kullanılmıştır.

3.1.1. Genetik Analiz

DNA eldesi

5 ml periferik venöz kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınıp, izolasyon aşamasına kadar -20°C'de saklanmıştır. DNA izolasyonu hastalara ait kan örneklerinden spin kolon (MN; Macherey-Nagel, Germany) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA örnekleri spektrofotometrede (NanoDrop, ND 1000, USA) ölçülmüştür.

Bu araştırmada hastaların DNA'larından PZR ve Restriksiyon Enzimleri ile MTRR, GSTM1, GSTT1 ve TS genlerindeki polimorfizmler incelenmiştir.

Primer Dizileri ve PZR Reaksiyon Şartları

- MTRR genindeki 66 A>G polimorfizmi için;

İleri primer 5' -AAGGCCATCGCAGAAGAcAT - 3'

Geri primer 5' - CCATTGAACAAACACATTTCTG -3' primer çifti

- GSTM1 geni Ekzon 6-7 arasındaki bölgenin amplifikasyonu için;

İleri primer 5' – GAGGAACTCCCTGAAAAGCTAAAG - 3'

Geri primer 5' – GGGCTCAAATATACGGTGGAG -3' primer çifti

- GSTT1 geni Ekzon 4-5 arasındaki bölgenin amplifikasyonu için;

İleri primer 5' – CTCCTTACTGGTCCTCACATCTC - 3'

Geri primer 3' – GTTCCCAGCTCACCGGAT - 5' primer çifti

- HBB geninin (internal kontrol) amplifikasyonu için;

İleri primer 5' – GAAGAGCCAAGGACAGGTACG - 3'

Geri primer 3' – CCAACTTCATCCACGTTACACC - 5' primer çifti ve

- TS genindeki tekrar dizisinin belirlenmesi için;

İleri primer 5' – AACTGTGCTGCTGGCTTAGAGAA - 3'

Geri primer 3' – GCGTCACCTCTCAGGCTGTA - 5' primer çifti kullanılmıştır.

Bu reaksiyonlar için; PZR tüpünde son hacim 25 µl olup içeriği şu şekildedir: Her primerden (10 pmol) 0.5 µl, MgCl₂ (25 mM) 2 µl, dNTP (10 mM) 0,5 µl, PZR tamponu 2,5 µl, Taq DNA polimeraz (5 U / 50 µl) 0.3µl, DNA 5 µl (20 ng), 13,7µl distile su. Polimeraz Zincir Reaksiyonu için hazırlanan bu karışım 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldı ve üzerine saflaştırılan genomik DNA eklendi. Tüm PZR'lerde negatif kontrol olarak DNA içermeyen steril su kullanıldı. Tüm işlemler, tepkimenin doğru gerçekleşmesi için buz üstünde yapıldı.

Yukarıdaki gen bölgelerine ait PZR işlemini gerçekleştirmek için, termal döngü cihazı aşağıda belirtilen ortak sıcaklık ve sürelerle göre ayarlandı.

Başlangıç Denatürasyonu;	94 °C' de 5 dk	(1 Döngü)
Denatürasyon aşaması;	94 °C' de 30 sn	} (30 Döngü)
Hibridizasyon aşaması;	60 °C' de 30 sn	
Sentez (Uzama) aşaması;	72 °C' de 30 sn	
Son sentez aşaması;	72 °C' de 5 dk	(1 Döngü)

3.1.2. Çoğaltılmış DNA'ların Jel Elektroforezde Değerlendirilmesi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucu oluşan DNA'ları yürütmek için %2'lik agaroz jel hazırlandı. 5 µl PZR ürünü 3 µl yükleme boyasıyla karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 120 voltta 60 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Ultraviyole lamba altında PZR'de kullanılan primer çiftlerine göre oluşan DNA bantları incelendi. MTRR gen bölgesi için 220 baz çifti (b.ç.), GSTM1 gen bölgesi için 219 b.ç., GSTT1 gen bölgesi için 470 b.ç., HBB internal kontrol

bölgesi için 269 b.ç. ve TYMS gen bölgesi için ise 578, 606, 634 b.ç.'lik ürünler elde edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

- MTRR geni polimorfizmi

MTRR genindeki 66 A/G polimorfizmini tanımlamak için AflIII restriksiyon enzimi kullanılmıştır. AflIII restriksiyon enziminin tanıma bölgesi şu şekildedir:

5' – ACRYGT – 3'

3' – TGYRCA – 5'

Deneyin Yapılışı: 0.2 ml'lik ependorf tüpünün içine 15 µl PZR ürünü, 1.6 µl tampon, 10 ünite AflIII restriksiyon enzimi eklendi. Karışım 37°C'lik etüvde bir gece (16 saat) inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplerden alınan 8 µl kesim ürünü ile 3 µl yükleme boyası ile karıştırılarak %3'lük agaroz jele yüklendi. %3'lük agaroz jelde 50 baz çiftlik moleküler ağırlık belirteci ve enzim kesimi yapılmamış PZR ürünü eşliğinde 120 voltta 2 saat sabit akımda yürütülüp ultraviyole lamba altında incelenip fotoğrafı çekildi.

- GSTM1 gen bölgesi

Deneyin Yapılışı: GSTM1 genine ait amplifiye edilen bölge ile internal kontrol olarak kullanılan HBB genine ait amplifikasyon ürünlerinden 5 µl alınarak 3 µl yükleme boyası ile karıştırıldı ve %3'lük agaroz jele yüklendi. %3'lük agaroz jelde 50 baz çiftlik moleküler ağırlık belirteci ve enzim kesimi yapılmamış PZR

ürünü eşliğinde 120 voltta 2 saat sabit akımda yürütölüp ultraviyole lamba altında incelenip fotoğrafı çekildi.

- GSTT1 gen bölgesi

Deneyin Yapılışı: GSTT1 genine ait amplifiye edilen bölge ile internal kontrol olarak kullanılan HBB genine ait amplifikasyon ürünlerinden 5 µl alınarak 3 µl yükleme boyası ile karıştırıldı ve %3'lük agaroz jele yüklendi. %3'lik agaroz jelde 50 baz çiftlik moleküler ağırlık belirteci ve enzim kesimi yapılmamış PZR ürünü eşliğinde 120 voltta 2 saat sabit akımda yürütölüp ultraviyole lamba altında incelenip fotoğrafı çekildi.

- TS gen polimorfizmi

Deneyin Yapılışı: TS geni TSER polimorfizmini tanımlamak için 5 µl amplifikasyon ürünü ile 3 µl yükleme boyası ile karıştırılarak %3'lük agaroz jele 50 baz çiftlik moleküler ağırlık belirteci ve enzim kesimi yapılmamış PZR ürünü ile yüklendi. Örnekler 120 voltta 2 saat sabit akımda yürütölüp ultraviyole lamba altında incelenip fotoğrafı çekildi.

- MTRR gen polimorfizminin değeriendirilmesi

Belirtilen şartlara göre gerçekleştirilen PZR sonrasında 220 b.ç. uzunluğunda bir amplifikasyon ürünü elde edildi. PZR ürünü AflIII restriksiyon enzimi ile kesildi. 203 ve 17 b.ç.'lik iki adet bant görüldüğünde G alleli, kesim

olmadığında ise (220 b.ç.) A alleli olarak değerlendirildi. Agaroz jelde elde edilen bantlara göre genotipler belirlendi.

- GSTM1 gen bölgesinin değerlendirilmesi

Belirtilen şartlara göre gerçekleştirilen PZR sonrasında GSTM1 için 219 b.ç. uzunluğunda bir amplifikasyon ürünü elde edildi. PZR ürünü 269 b.ç.'lik HBB internal kontrolü ile birlikte yürütüldü. Agaroz jelde elde edilen 269 ve 219 b.ç.'lik bantlar elde edildiğinde GSTM1'in gen bölgesinin varlığını, sadece 269 b.ç.'lik internal kontrolün saptandığında ise GSTM1 gen bölgesinin yokluğunu (null) göstermiştir.

- GSTT1 gen bölgesinin değerlendirilmesi

Belirtilen şartlara göre gerçekleştirilen PZR sonrasında GSTT1 için 470 b.ç. uzunluğunda bir amplifikasyon ürünü elde edildi. PZR ürünü 269 b.ç.'lik HBB internal kontrolü ile birlikte yürütüldü. Agaroz jelde elde edilen 470 ve 269 b.ç.'lik bantlar elde edildiğinde GSTT1'in gen bölgesinin varlığını, sadece 269 b.ç.'lik internal kontrolün saptandığında ise GSTT1 gen bölgesinin yokluğunu (null) göstermiştir.

- TS gen polimorfizmi değerlendirilmesi

Belirtilen şartlara göre gerçekleştirilen PZR sonrasında 578 b.ç. uzunluğunda bir amplifikasyon ürünü elde edildi. PZR ürünü agaroz jelde yürütüldü. 578 b.ç.'lik tek bant elde edildiğinde 2R/2R; 606 ve 578 b.ç.'lik iki

bant elde edildiğinde 2R/3R; 606 b.ç.'lik tek bir bant elde edildiğinde 3R/3R ve 634 ve 606 b.ç.'lik iki bant elde edildiğinde ise 3R/4R genotipi olarak değerlendirilmiştir.

3.2. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler SPSS 15.0 bilgisayar programında analiz edildi. İstatistiksel analizler öncesinde verilerin normal dağılıp dağılmadığı değerlendirildi. Normal dağılan veriler için parametrik testler; normal dağılmayan veriler için nonparametrik testler; kategorik veriler için ki-kare testi kullanıldı. İkili veya çoklu karşılaştırmalarda sayısal veriler için normal dağılıyorsa Student t testi veya Anova testi; normal dağılmıyorsa Mann Whitney u testi kullanıldı. Yaşam analizi Kaplan Meier yöntemi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 106 ALL’li olgunun demografik verileri ve tanı sırasındaki hematolojik bulguları Tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 4. Hastaların demografik verileri

		Vaka sayısı (n)	%
Cinsiyet	Erkek	67	63.2
	Kız	39	36.8
Yaş	<1	1	0.9
	1-5	55	51.9
	≥6	50	47.2
Hepatosplenomegali	Var	64	65.3
	Yok	34	34.6
Lökosit (mm³)	<20.000	64	64
	≥20.000	36	36
İmmunfenotip	Pre-B	51	48.1
	B	12	11.3
	T	15	14.2
	Diğer	28	26.4
Sitogenetik	t(9;22) (+)	2	1.9
	t(4;11) (+)	1	0.9
	t(9;22)/t(4;11)(-)	103	97.1
Risk grupları	SR	29	27.4
	MR	61	57.5
	HR	16	15.1

Çalışmamıza alınan hastaların %63.2’si erkek, %51.9’u 1-5 yaş arasında olup; %65.3’ünde başvuru anında hepatosplenomegali vardı. Hastaların %64’ünün lökosit sayısı 20.000/mm³ altında, %48.1’inde pre-B ALL, %11.3’ünde B-ALL ve %14.2’sinde T-ALL immünfenotipi saptandı. Sitogenetik olarak 2

hastada t(9;22) translokasyonu bulunurken, 1 hastada t(4;11) translokasyonu tespit edildi. Tüm lösemili hastaların %27.4'ü standart risk grubunda yer alırken %57.5'i orta risk grubunda ve %15.1'i yüksek risk grubunda idi.

4.1. Gen Polimorfizm Sıklığı

Hastalarda MTRR, GSTM1, GSTT1, TS, MTHFR gen polimorfizminin risk gruplarına göre dağılımı Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Çalışmaya alınan hastalarda polimorfizm sıklığının hastaların genel ve risk gruplarına göre dağılımı

Genotip		Total n(%)	SR n(%)	MR n(%)	HR n(%)
MTRR A66G	AA [¶]	22 (20.8)	7 (24.1)	12 (19.7)	3 (18.8)
	AG ^{¶¶}	46 (43.4)	11 (37.9)	26 (42.6)	9 (56.2)
	GG ^{¶¶¶}	38 (35.8)	11 (37.9)	23 (37.7)	4 (25.0)
GSTM1	(+)*	51 (48.1)	16 (55.2)	29 (47.5)	6 (37.5)
	(-)**	55 (51.9)	13 (44.8)	32 (52.5)	10 (62.5)
GSTT1	(+)*	90 (84.9)	24 (82.8)	52 (85.2)	14 (87.5)
	(-)**	16 (15.1)	5 (17.2)	9 (14.8)	2 (12.5)
TS	2R/2R [¶]	18 (17.0)	3 (10.3)	13 (21.3)	2 (12.5)
	2R/3R ^{¶¶}	51 (48.1)	16 (55.2)	28 (45.9)	7 (43.8)
	3R/3R ^{¶¶¶}	35 (33.0)	10 (34.5)	20 (32.8)	5 (31.2)
	3R/4R ^{¶¶¶}	2 (1.9)	-	-	2 (12.5)
MTHFR C677T	CC [¶]	21 (48.8)	6 (60.0)	13 (43.4)	2 (66.7)
	CT ^{¶¶}	18 (41.8)	4 (40.0)	13 (43.3)	1 (33.3)
	TT ^{¶¶¶}	4 (9.3)	-	4 (13.3)	-
MTHFR A1298C	AA [¶]	22 (51.2)	4 (40.0)	15 (50.0)	3 (100.0)
	AC ^{¶¶}	16 (37.2)	4 (40.0)	12 (40.0)	-
	CC ^{¶¶¶}	5 (11.6)	2 (20.0)	3 (10.0)	-

(+)*: enzim aktivitesi olan normal genotipleri, (-)** enzim aktivitesi olmayan null (anlamsız) genotipleri, [¶]: normal genotip, ^{¶¶}: heterozigot genotip, ^{¶¶¶}: homozigot genotip.

Çalışmamıza alınan hastaların risk gruplarının gen polimorfizm sıklığına göre değerlendirilmesinde MTRR enzimine ait polimorfik varyantlar içinde AG varyantının %43.4 ile en sık, GG varyantının %35.8 ile ikinci sıklıkta bulunduğu ve %20.8 ile AA varyantının en az sıklıkta olduğu tespit edilmiştir. Yine MTRR enzimine ait AG varyantının orta ve yüksek risk gruplarında en sık rastlanılan varyant olduğu bulunmuştur. GSTM1 enziminin anlamsız genotipini taşıyan hastalara ait polimorfizm tüm grup içinde %51.9 oranında bulunurken grup içi değerlendirmede en fazla yüksek risk grubunda %62.5 oranında dağıldığı bulunmuştur. GSTT1 enziminin anlamsız genotipini taşıyan hastalara ait polimorfizmin tüm grup içinde %15.1 oranında bulunurken, grup içi değerlendirmede en yüksek standart risk grubunda %17.2 oranında dağıldığı bulunmuştur. Timidilat sentaz enzimine ait polimorfik varyantlar içinde 2R/3R varyantının %48.1 ile en sık, %33.0 ile 3R/3R varyantının ikinci sıklıkta bulunduğu %17.0 ile 2R/2R varyantının üçüncü sıklıkta ve %1.9 ile 3R/4R varyantının en az sıklıkta olduğu tespit edilmiştir. Yine TS enzimine ait 2R/3R varyantının tüm risk gruplarında en sık rastlanılan varyant olduğu bulunmuştur. MTHFR enzimine ait polimorfik varyantlar içinde C677T heterozigot formu (CT) tüm grupta %41.8, homozigot formu (TT) %9.3 oranında; A1298C heterozigot formu (AC) tüm grupta %37.2, homozigot formu (CC) ise %11.6 oranında bulunduğu tespit edilmiştir. Yine grup içi değerlendirmede C677T TT varyantın %13.3 ile orta risk grubunda en sık, A1298C CC varyantı %20.0 ile standart risk grubunda dağıldığı görülmüştür.

Tablo 6. Relaps ve ağır (evre III-IV) toksisite olan hastalarda polimorfik gen sıklıkları

Genotip		Relaps n(%)	Toksisite n(%)
MTRR A66G	AA	2/17 (11.8)	1/13 (7.7)
	AG	10/ 17 (58.8)	6/13 (46.2)
	GG	5/17 (29.4)	6/13 (46.2)
GSTM1	(+)	7/17 (41.2)	5/13 (38.5)
	(-)	10/17 (58.8)	8/13 (61.5)
GSTT1	(+)	15/17 (88.2)	3/13 (23.1)
	(-)	2/17 (11.8)	10/13 (76.9)
TS	2R/2R	3/17 (17.6)	1/13 (7.7)
	2R/3R	6/17 (35.3)	7/13 (53.8)
	3R/3R	7/17 (41.2)	4/13 (30.8)
	3R/4R	1/17 (5.9)	1/13 (7.7)
MTHFR C677T [¶]	CC	2/7 (28.6)	4/7 (57.2)
	CT	4/7 (57.1)	2/7 (28.6)
	TT	1/7 (14.3)	1/7 (14.3)
MTHFR A1298C [¶]	AA	5/7 (71.4)	3/7 (42.9)
	AC	2/7 (28.6)	3/7 (42.9)
	CC	-	1/7 (14.3)

[¶]: Relaps (n:17) ve toksisite (n:13) gelişen 7 hastanın MTHFR enzimine ait gen polimorfizm sonuçları

Relaps sıklığına ve toksisite oranına göre gen polimorfizm sıklığı değerlendirilmesinde MTRR enzimine ait polimorfik varyantlar içinde AG varyantının en sık, GG varyantının ise ikinci sıklıkta olduğu bulunmuştur. GSTM1 enziminin anlamsız genotipini taşıyan hastalara ait polimorfizmin relaps olan olgularda %58.8 oranında, toksisite gelişen olgularda ise %61.5 oranında olduğu saptanmıştır. GSTT1 enziminin anlamsız genotipini taşıyan hastalara ait polimorfizmin relaps olan olgularda %11.8 oranında, toksisite gelişen olgularda ise %76.9 oranında olduğu tespit edilmiştir. TS enzimine ait polimorfik varyantlar içinde 3R/3R varyantının en sık, 2R/3R varyantının ise ikinci sıklıkta relaps

gelişen olgularda bulunduğu; buna karşılık toksisite gelişen olgularda 2R/3R varyantının en sık, 3R/3R varyantının ise ikinci sıklıkta bulunduğu saptanmıştır. MTHFR enzimine ait polimorfik varyantlar içinde C677T varyantının homozigot (TT) formunun relaps ve toksisite gelişen olgularda %14.3 oranında olduğu bulunmuştur. MTHFR A1298C varyantının homozigot (CC) formu relaps gelişen olgularda hiç görülmezken toksisite gelişen olgularda %14.3 oranında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 7. Hastaların gen polimorfizm sıklığının ağır (evre III-IV) toksisite tipine göre dağılımı

Genotip		Hematolojik n(%)	Hepatik n(%)	Nörolojik n(%)	Kardiak n(%)	Kemik- eklem n(%)
MTRR A66G	AA	-	-	-	-	1 (33.3)
	AG	1 (50.0)	1 (33.3)	2 (50.0)	1 (100.0)	1 (33.3)
	GG	1 (50.0)	2 (66.7)	2 (50.0)	-	1 (33.3)
GSTM1	(+)	2 (100.0)	-	2 (50.0)	-	1 (33.3)
	(-)	-	3 (100.0)	2 (50.0)	1 (100.0)	2 (66.7)
GSTT1	(+)	2 (100.0)	3 (100.0)	4 (100.0)	-	1 (33.3)
	(-)	-	-	-	1 (100.0)	2 (66.7)
TS	2R/2R	1 (50.0)	-	-	-	-
	2R/3R	-	2 (66.7)	3 (75.0)	-	2 (66.7)
	3R/3R	1 (50.0)	1 (33.3)	1 (25.0)	-	1 (33.3)
	3R/4R	-	-	-	1(100.0)	-
MTHFR C677T	CC	-	2 (100.0)		1 (100.0)	1 (100.0)
	CT	1 (100.0)	-	1 (50.0)	-	-
	TT	-	-	1 (50.0)	-	-
MTHFR A1298C	AA			1 (50.0)	1(100.0)	1(100.0)
	AT	1 (100.0)	1 (50.0)	1(50.0)	-	-
	CC	-	1 (50.0)	-	-	-

Çalışmamıza alınan hastaların 17'si relaps olan olgular olup 13 olguda ise ileri evre tedavi kesimini gerektiren toksisite gelişmiştir. Toksisite gelişen olgulardan 4'ü SSS toksisitesi (inme, ensefalopati), 1'i hepatik venookluzif hastalığın geliştiği karaciğer toksisitesi, 3'ü kemik ve eklem harabiyetinin geliştiği osteonekrozlu olgular, 2'si karaciğer enzim yüksekliği ile seyreden olgular, 1'i ileri evre karaciğer ve kardiyak bozukluğu bulunan olgu olup, iki olgu ise ağır aplazi ile karakterizedir. Bu olgular içinde ileri evre karaciğer ve kardiyak bozukluk gelişen sadece 1 olgu relaps olmuştur. Bu olguda TS enzimine ait 3R/4R polimorfik alleli saptanmıştır. Hepatik venookluzik hastalık nedeniyle kaybedilen standart risk ALL'li bir olguda hem MTRR (GG) hem de MTHFR A1298C enziminde homozigot (CC) tipte varyant allel bulunmuştur. Aplazi gelişen olgulardan birinde TS enziminde 3R/3R varyantı saptanmıştır. Diğer olguda ise MTRR'de homozigot varyant (GG) bulunmuştur. Bu olgulardan hepatik venookluziv hastalıklı bir olgu ile inme geçiren ikinci olgu enfeksiyon nedeniyle, kardiyak ve hepatik toksisiteli üçüncü olgu ise toksisite nedeniyle kaybedilmiştir (Tablo 7).

4.2. Kemoterapi İlişkili Enzimlerdeki Gen Polimorfizmi Tipine Göre Kemoterapi Etkinlik ve Toksisite Değerlendirilmesi

4.2.1. MTRR, TS, MTHFR C677T, MTHFR A1298C Gen Polimorfizmleri

Akut lenfoblastik lösemi BFM-95 kemoterapi protokolü protokol M tedavisi sırasında 5g/m^2 metotreksat tedavisi alan hastalarda monitörize edilen metotreksat kan düzeyleri hasta dosyalarından 4 farklı siklus için geriye dönük

tarandı. Hastalarda bulunan her bir gen polimorfizmi varlığına göre her siklus için kaydedilen kan metotreksat düzeyleri karşılaştırıldı.

Tablo 8. Metotreksat kan düzeylerinin MTRR GG gen polimorfizmi varlığına göre karşılaştırılması

MTRR	1.siklus		p	2.siklus		p	3.siklus		p	4.siklus		p
A66G	Metotreksat			Metotreksat			Metotreksat			Metotreksat		
GG												
Mutasyon	(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)	
24.saat	57.7±30.9	51.2±31.9	0.401	60.8±41.1	49.8±32.0	0.237	56.1±37.0	55.1±38.8	0.915	38.7±20.8	52.6±34.8	0.073
36.saat	1.6±1.5	2.4±5.2	0.397	2.0±3.8	1.3±0.8	0.273	1.6±1.5	1.6±2.0	0.871	1.2±0.8	1.2±1.6	0.978
42.saat	0.8±1.2	0.5±0.3	0.184	0.6±0.5	0.6±0.3	0.853	0.6±0.4	0.5±0.3	0.752	0.4±0.2	0.5±0.3	0.677
48.saat	0.5±1.0	0.4±0.2	0.521	0.4±0.3	0.4±0.2	0.765	0.3±0.1	0.3±0.1	0.697	0.2±0.1	0.3±0.2	0.229

Hastalarda 4 farklı siklus için bakılan kan metotreksat düzeylerinin MTRR GG gen polimorfizminin olup olmamasına göre yapılan karşılaştırılmasında kan metotreksat düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 8).

Tablo 9. Metotreksat kan düzeylerinin TS 3R/3R gen polimorfizmi varlığına göre karşılaştırılması

TS	1.siklus		p	2.siklus		p	3.siklus		p	4.siklus		p
3R/3R	Metotreksat			Metotreksat			Metotreksat			Metotreksat		
Mutasyon	(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)	
24.saat	62.0±41.1	50.6±26.0	0.178	73.2±44.5	46.2±28.8	0.006	71.1±46.7	48.8±31.4	0.027	56.1±38.5	42.9±25.8	0.110
36.saat	1.7±1.6	2.2±4.6	0.633	2.0±4.2	1.5±1.3	0.463	1.9±2.0	1.5±1.7	0.338	1.6±2.3	1.0±0.6	0.112
42.saat	0.9±1.3	0.5±0.3	0.087	0.6±0.3	0.6±0.4	0.793	0.6±0.4	0.5±0.4	0.531	0.5±0.2	0.4±0.3	0.386
48.saat	0.7±1.1	0.4±0.2	0.132	0.4±0.2	0.3±0.2	0.266	0.3±0.1	0.3±0.1	0.789	0.3±0.2	0.3±0.1	0.068

Hastalarda 4 farklı siklus için bakılan kan metotreksat düzeylerinin TS 3R/3R gen polimorfizminin olup olmamasına göre yapılan karşılaştırılmasında polimorfizm bulunan olgularda bulunmayanlara göre 2. ve 3. siklus 24. saat kan metotreksat düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 9).

Tablo 10. Metotreksat kan düzeylerinin TS (3R/3R) ve MTRR (GG) kombine gen polimorfizmi varlığına göre karşılaştırılması

TS 3R/3R MTRR GG	1.siklus Metotreksat		p	2.siklus Metotreksat		p	3.siklus Metotreksat		p	4.siklus Metotreksat		p
Mutasyon	(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)	
24.saat	73.5±39.9	50.6±28.7	0.032	87.3±46.2	48.9±31.5	0.002	62.3±38.3	54.3±37.9	0.544	44.7±25.0	47.4±31.6	0.810
36.saat	2.3±2.1	2.0±4.2	0.804	3.2±6.0	1.4±1.2	0.049	2.2±2.3	1.5±1.7	0.274	1.4±1.0	1.2±1.4	0.611
42.saat	1.5±1.9	0.5±0.3	0.000	0.7±0.4	0.6±0.4	0.617	0.8±0.6	0.5±0.3	0.102	0.6±0.4	0.4±0.2	0.132
48.saat	1.0±1.6	0.4±0.2	0.006	0.5±0.3	0.4±0.2	0.277	0.4±0.1	0.3±0.1	0.266	0.3±0.1	0.3±0.2	0.765

Hastalarda 4 farklı siklus için bakılan kan metotreksat düzeylerinin hem TS 3R/3R hem de MTRR GG gen polimorfizminin olup olmamasına göre yapılan karşılaştırılmasında 1.siklus 24.saat, 42. saat ve 48 saat ile 2. siklus 24. saat ve 36. saat kan metotreksat düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 10).

Tablo 11. Metotreksat kan düzeylerinin MTHFR C677T TT polimorfizmi varlığına göre karşılaştırılması

MTHFR C677T TT	1.siklus Metotreksat		p	2.siklus Metotreksat		p	3.siklus Metotreksat		p	4.siklus Metotreksat		p
Mutasyon	(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)	
24.saat	50.4±18.9	56.4±29.3	0.693	42.5±44.2	54.8±31.7	0.489	45.6±28.2	56.7±37.4	0.573	30.5±23.7	42.0±27.1	0.430
36.saat	1.2±0.4	2.7±5.5	0.602	2.7±3.4	1.7±3.3	0.600	1.0±0.3	1.9±2.3	0.486	0.6±0.2	1.1±0.6	0.175
42.saat	0.3±0.1	0.6±0.5	0.285	0.7±0.3	0.6±0.5	0.892	0.5±0.2	0.6±0.4	0.706	0.4±0.1	0.4±0.1	0.806
48.saat	0.3±0.02	0.4±0.2	0.518	0.5±0.1	0.3±0.2	0.141	0.3±0.2	0.3±0.1	0.830	0.4±0.2	0.3±0.1	0.047

Hastalarda 4 farklı siklus için bakılan kan metotreksat düzeylerinin MTHFR C677T TT polimorfizminin olup olmamasına göre yapılan karşılaştırılmasında polimorfizm bulunan olgularda bulunmayanlara göre 4. siklus 48. saat kan metotreksat düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 11).

Tablo 12. Metotreksat kan düzeylerinin MTHFR A1298C CC polimorfizmi varlığına göre karşılaştırılması

MTHFR A1298C CC	1.siklus Metotreksat		p	2.siklus Metotreksat		p	3.siklus Metotreksat		p	4.siklus Metotreksat		p
Mutasyon	(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)	
24.saat	52.6±40.2	56.1±27.2	0.820	59.6±62.0	52.6±28.8	0.696	59.5±57.0	54.9±34.3	0.815	17.5±5.1	42.9±26.9	0.117
36.saat	1.2±0.2	2.7±5.4	0.649	6.8±10.9	1.4±1.4	0.006	3.3±3.6	1.6±2.0	0.148	0.9±0.7	1.1±0.6	0.673
42.saat	0.4±0.1	0.6±0.5	0.494	0.7±0.6	0.6±0.4	0.915	1.0±0.9	0.5±0.2	0.035	0.3±0.1	0.4±0.1	0.209
48.saat	0.3±0.09	0.4±0.2	0.581	0.5±0.2	0.3±0.2	0.126	0.3±0.2	0.3±0.1	0.670	0.4±0.3	0.3±0.1	0.385

Hastalarda 4 farklı siklus için bakılan kan metotreksat düzeylerinin MTHFR A1298C CC gen polimorfizminin olup olmamasına göre yapılan karşılaştırılmasında polimorfizm bulunan olgularda bulunmayanlara göre 2. siklus 36. saat ve 3. siklus 42. saat kan metotreksat düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 12).

Tablo 13. Protokol M öncesi Hb, BK, ANS, Platelet, AST, ALT, Bilirubin düzeylerinin DSÖ toksisite kriterlerine göre evrelendirilmesi ve TS, MTRR, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmlerine göre dağılımı

Protokol M öncesi toksisite	MTRR A66G		TS		MTHFR C677T		MTHFR A1298C	
	AA	AG/GG	2R/2R	2R/3R 3R/3R	CT	TT	AC	CC
HB[†]								
Evre 0	%23.1	%26.5	%27.3	%25.5	%23.1	%66.7	%23.1	-
Evre I	%69.2	%49.0	%36.4	%56.9	%69.2	-	%61.5	%100.0
Evre II	%7.7	%16.3	%27.3	%11.8	%7.7	%33.3	%15.4	-
Evre III	-	%6.1	%9.1	%3.9	-	-	-	-
Evre IV	-	%2.0	-	%2.0	-	-	-	-
BK[†]								
Evre 0	%46.2	%49.0	%54.5	%47.1	%46.2	%66.7	%53.8	%50.0
Evre I	%23.1	%20.4	%18.2	%21.6	%23.1	-	%15.4	%50.0
Evre II	%23.1	%28.6	%27.3	%27.5	%30.8	%33.3	%30.8	-
Evre III	%7.7	%2.0	-	%3.9	-	-	-	-
Evre IV	-	-	-	-	-	-	-	-

Protokol M öncesi toksisite	MTRR A66G		TS		MTHFR C677T		MTHFR A1298C	
	AA	AG/GG	2R/2R	2R/3R 3R/3R	CT	TT	AC	CC
ANS[¶]								
Evre 0	%38.5	%32.7	%45.5	%31.4	%30.8	%66.7	%30.8	%50.0
Evre I	%15.4	%14.3	%9.1	%15.7	%15.4	-	%7.7	%50.0
Evre II	%23.1	%18.4	%27.3	%17.6	%7.7	-	%15.4	-
Evre III	%23.1	%22.4	%9.1	%25.5	%30.8	-	%23.1	-
Evre IV	-	%12.2	%9.1	%9.8	%15.4	%33.3	%23.1	-
PLT[¶]								
Evre 0	%92.3	%95.9	%90.9	%96.1	%100.0	%100.0	%100	%100
Evre I	%7.7	%2.0	%9.1	%2.0	-	-	-	-
Evre II	-	%2.0	-	%2.0	-	-	-	-
AST[¶]								
Evre 0	%84.6	%85.1	%75.0	%87.5	%92.3	%50.0	%84.6	%66.7
Evre I	%15.4	%14.9	%25.0	%12.5	%7.7	%50.0	%15.4	%33.3
Evre II	-	-	-	-	-	-	-	-
Evre III	-	-	-	-	-	-	-	-
Evre IV	-	-	-	-	-	-	-	-
ALT[¶]								
Evre 0	%69.2	%85.1	%75.0	%83.3	%76.9	%75.0	%69.2	%66.7
Evre I	%30.8	%14.9	%25.0	%16.7	%23.1	%25.0	%30.8	%33.3
Evre II	-	-	-	-	-	-	-	-
Evre III	-	-	-	-	-	-	-	-
Evre IV	-	-	-	-	-	-	-	-
T.BİL[¶]								
Evre 0	%84.6	%97.8	%100.0	%93.6	%92.3	%75.0	%92.3	%66.7
Evre I	%7.7	%2.2	-	%4.3	-	%25.0	-	%33.3
Evre II	-	-	-	-	-	-	-	-
Evre III	%7.7	-	-	%2.1	%7.7	-	%7.7	-
Evre IV	-	-	-	-	-	-	-	-

[¶]: Hb: Hemoglobin, BK: Beyaz Küre, ANS: Absolut Nötrofil Sayısı, PLT: Trombosit sayısı, AST: Aspartat Aminotransferaz, ALT: Alanin Aminotransferaz, T.BİL: Total Bilirubin

Tablo 14. Protokol M sonu Hb, BK, ANS, Platelet, AST, ALT, Bilirubin düzeylerinin DSÖ toksisite kriterlerine göre evrelendirilmesi ve TS, MTRR, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmlerine göre dağılımı

Protokol M sonu toksisite	MTRR A66G		TS		MTHFR C677T		MTHFR A1298C	
	AA	AG/GG	2R/2R	2R/3R 3R/3R	CT	TT	AC	CC
HB								
Evre 0	%33.3	%25.0	%12.5	%28.9	%10.0	%66.7	%11.1	%100.0
Evre I	%33.3	%55.0	%62.5	%50.0	%70.0	%33.3	%66.7	-
Evre II	%33.3	%12.5	%12.5	%15.8	%10.0	-	%11.1	-
Evre III	-	%5.0	-	%5.3	%10.0	-	%11.1	-
Evre IV	-	%2.5	%12.5	-	-	-	-	-
BK								
Evre 0	%33.3	%30.0	%12.5	%34.2	%30.0	%66.7	%44.4	%100.0
Evre I	%16.7	%20.0	%25.0	%18.4	%30.0	%33.3	%22.2	-
Evre II	%16.7	%27.5	%37.5	%23.7	%40.0	-	%33.3	-
Evre III	%33.3	%20.0	%12.5	%23.7	-	-	-	-
Evre IV	-	%2.5	%12.5	-	-	-	-	-
ANS								
Evre 0	-	%30.0	%25.0	%26.3	%40.0	%33.3	%44.4	%100.0
Evre I	%33.3	%5.0	%25.0	%5.3	%10.0	%66.7	%11.1	-
Evre II	%33.3	%35.0	-	%42.1	%50.0	-	%44.4	-
Evre III	%16.7	%12.5	%37.5	%7.9	-	-	-	-
Evre IV	%16.7	%17.5	%12.5	%18.4	-	-	-	-
PLT								
Evre 0	%100.0	%92.5	%87.5	%94.7	%90.0	%100.0	%89.9	%100.0
Evre I	-	%5.0	-	%5.3	%10.0	-	%11.1	-
Evre II	-	-	-	-	-	-	-	-
Evre III	-	%2.5	%12.5	-	-	-	-	-
Evre IV	-	-	-	-	-	-	-	-
AST								
Evre 0	%83.3	%85.4	%100.0	%81.6	%90.0	%100.0	%88.9	%100.0
Evre I	%16.7	%9.8	-	%13.2	-	-	-	-
Evre II	-	-	-	-	-	-	-	-
Evre III	-	%4.9	-	%5.3	%10.0	-	%11.1	-
Evre IV	-	-	-	-	-	-	-	-
ALT								
Evre 0	%83.3	%65.9	%66.7	%68.4	%60.0	%100.0	%66.7	%100.0
Evre I	-	%24.4	%33.3	%18.4	%30.0	-	%22.2	-
Evre II	%16.7	%4.9	-	%7.9	%10.0	-	%11.1	-
Evre III	-	%4.9	-	%5.3	-	-	-	-
Evre IV	-	-	-	-	-	-	-	-
T.BİL								
Evre 0	%100.0	%90.2	%100.0	%89.5	%90.0	%100.0	%88.9	%100.0
Evre I	-	%4.9	-	%5.3	-	-	-	-
Evre II	-	%4.9	-	%5.3	%10.0	-	%11.1	-
Evre III	-	-	-	-	-	-	-	-
Evre IV	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 15. Protokol I sonu Hb, BK, ANS, Platelet, AST, ALT, T.bilirubin düzeylerinin DSÖ toksisite kriterlerine göre evrelendirilmesi ve TS, MTRR, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmlerine göre dağılımı

Protokol I Sonu Toksosite	MTRR A66G		TS		MTHFR C677T		MTHFR A1298C	
	AA	AG/GG	2R/2R	2R/3R 3R/3R	CT	TT	AC	CC
HB								
Evre 0	-	-	-	-	-	-	-	-
Evre I	%15.4	%11.6	%30.0	%8.7	%16.7	-	%27.3	-
Evre II	%46.2	%41.9	%20.0	%47.8	%41.7	%100.0	%54.5	%33.3
Evre III	%23.1	%37.2	%50.0	%30.4	%33.3	-	%18.2	%33.3
Evre IV	%15.4	%9.3	-	%13.0	%8.3	-	-	%33.3
BK								
Evre 0	%15.4	%11.6	%10.0	%13.0	%16.7	-	%36.4	-
Evre I	%30.8	%18.6	%10.0	%23.9	%25.0	%33.3	%18.2	-
Evre II	%30.8	%27.9	%20.0	%30.4	%25.0	%33.3	%18.2	-
Evre III	%7.7	%34.9	%50.0	%23.9	%33.3	%33.3	%27.3	33.3
Evre IV	%15.4	%7	%10.0	%8.7	-	-	-	66.7
ANS								
Evre 0	%15.4	%7.0	-	%10.9	%16.7	-	%9.1	-
Evre I	-	%7.0	%20.0	%2.2	-	-	-	-
Evre II	-	%20.9	%30.0	%13.0	%25	%33.3	%18.2	-
Evre III	%46.2	%34.9	%10.0	%43.5	%41.7	-	%54.5	-
Evre IV	%38.5	%30.2	%40.0	%30.4	%16.7	%66.7	%18.2	%100.0
PLT								
Evre 0	%46.2	%48.8	%60.0	%45.7	%50.0	%33.3	%63.6	%33.3
Evre I	%7.7	%9.3	%10.0	%8.7	%8.3	%33.3	-	-
Evre II	%23.1	%9.3	-	%15.2	%16.7	-	%27.3	-
Evre III	%15.4	%30.2	%30.0	%26.1	%25.0	%33.3	%9.1	%66.7
Evre IV	%7.7	%2.3	-	%4.3	-	-	-	-
AST								
Evre 0	%93.3	%80.5	%80.0	%84.8	%92.9	%100.0	%100.0	%33.3
Evre I	%6.7	%19.5	%20.0	%15.2	%7.1	-	-	%66.7
ALT								
Evre 0	%80.0	%73.2	%70.0	%76.1	%78.6	%75.0	%75.0	%66.7
Evre I	%13.3	%17.1	%10.0	%17.4	%14.3	%25.0	%25.0	-
Evre II	%6.7	%9.8	%20.0	%6.5	%7.1	-	-	%33.3
T.BİL								
Evre 0	%93.3	%87.8	%80.0	%91.3	%92.9	%100.0	%100.0	%66.7
Evre I	%6.7	%12.2	%20.0	%8.7	%7.1	-	-	%33.3

Protokol I sonu kan değerlerinde bozukluk TS, MTRR, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmleri varlığında, hemoglobinde (HB) büyük oranda evre II düzeyinde düşüklük, beyaz kürede (BK) evre III-IV düzeyinde

düşüklük, nötrofil sayısında (ANS) evre III-IV düzeyinde düşüklük trombosit (PLT) sayısında etkilenme büyük oranda evre 0 düzeyinde olup daha az oranda diğer evrelerde etkilenme vardır. Yine AST, ALT ve T. Bilirubin düzeylerinde evre 0-II arası değişen oranlarda etkilenme izlenmektedir (Tablo 15).

Tablo 16. Protokol II sonu Hb, BK, ANS, Platelet, AST, ALT, T.bilirubin düzeylerinin DSÖ toksisite kriterlerine göre evrelendirilmesi ve TS, MTRR, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmlerine göre dağılımı

Protokol II Sonu Toksiste	MTRR A66G		TS		MTHFR C677T		MTHFR A1298C	
	AA	AG/GG	2R/2R	2R/3R 3R/3R	CT	TT	AC	CC
HB								
Evre 0	-	%4.3	%18.2	-	-	-	-	-
Evre I	%23.1	%6.5	-	%12.5	-	%25.0	-	-
Evre II	%15.4	%37.0	%9.1	%37.5	%15.4	%25.0	%36.4	%50.0
Evre III	%38.5	%39.1	%45.5	%37.5	%61.5	%25.0	%54.5	%25.0
Evre IV	%23.1	%13.0	%27.3	%12.5	%23.1	%25.0	%9.1	%25.0
BK								
Evre 0	%16.7	%8.7	%18.2	%8.5	%7.7	%25.0	%9.1	-
Evre I	%8.3	%10.9	%9.1	%10.6	%15.4	-	%9.1	-
Evre II	%25.0	%15.2	-	%21.3	%7.7	%25.0	%9.1	%25.0
Evre III	%8.3	%30.4	%36.4	%23.4	%15.4	-	%18.2	%25.0
Evre IV	%41.7	%34.8	%36.4	%36.2	%53.8	%50.0	%54.5	%50.0
ANS								
Evre 0	%25.0	%4.3	%9.1	%8.5	%7.7	%25.0	%9.1	-
Evre I	-	%17.4	%27.3	%10.6	%7.7	-	%9.1	-
Evre II	%8.3	%8.7	-	%10.6	-	-	-	-
Evre III	%16.7	%23.9	%27.3	%21.3	%23.1	%25.0	%18.2	-
Evre IV	%50.0	%45.7	%36.4	%48.9	%61.5	%50.0	%63.6	%100.0
PLT								
Evre 0	%23.1	%28.3	%27.3	%27.1	%23.1	%50.0	%18.2	-
Evre I	-	%2.2	-	%2.1	-	-	-	-
Evre II	%23.1	%15.2	%9.1	%18.8	%15.4	-	%18.2	-
Evre III	%46.2	%50.0	%54.5	%47.9	%53.8	%50.0	%54.5	%100.0
Evre IV	%7.7	%4.3	%9.1	%4.2	%7.7	-	%9.1	-
AST								
Evre 0	%53.8	%58.1	%72.7	%53.3	%46.2	%100.0	%45.5	%50.0
Evre I	%30.8	%37.2	%27.3	%37.8	%46.2	-	%36.4	%50.0
Evre II	%7.7	%4.7	-	%6.7	%7.7	-	%9.1	-
Evre III	%7.7	-	-	%2.2	-	-	%9.1	-
ALT								
Evre 0	%38.5	%32.6	%27.3	%35.6	%7.7	%50.0	%18.2	%50.0
Evre I	%30.8	%34.9	%45.5	%31.1	%46.2	%50.0	%27.3	%25.0
Evre II	%7.7	%25.6	%27.3	%20.0	%30.8	-	%27.3	%25.0
Evre III	%23.1	%7.0	-	%13.3	%15.4	-	%27.3	-
T.BİL								
Evre 0	%66.7	%69.8	%72.7	%68.2	%61.5	%75.0	%72.7	%25.0
Evre I	%8.3	%25.6	%27.3	%20.5	%38.5	-	%27.3	%50.0
Evre II	%25.0	%4.7	-	%11.4	-	%25	-	%25.0

Protokol II sonu kan değerlerinde bozukluk TS, MTRR, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmleri varlığında Hb’de büyük oranda evre II-III düzeyinde düşüklük, BK’de evre III-IV düzeyinde düşüklük, nötrofil sayısında evre III-IV düzeyinde düşüklük, trombosit sayısında etkilenme büyük oranda evre III düzeyinde olup daha az oranda diğer evrelerde etkilenme vardır. Yine AST, ALT ve T. bilirubin düzeylerinde evre 0-III arası değişen oranlarda etkilenme izlenmektedir (Tablo 16).

4.2.2. GSTM1, GSTT1 Gen Polimorfizmleri

Çalışmaya alınan hastaların ALL BFM-95 kemoterapi protokolü protokol I ve protokol II tedavisi sırasında 1g/m^2 siklofosfamid ve antrasiklin (Protokol I için daunorubisin ve Protokol II için doksorubisin) tedavisi öncesi ve tedavi bitiminde monitörize edilen tam kan sayımı ve biyokimyasal kan düzeyleri hasta dosyalarından her protokol önce ve sonrası geriye dönük tarandı.

Tablo 17. GSTM1 ve GSTT1 mutasyonu olan hastalarda antrasiklin, siklofosamid tedavisi öncesi ve sonrası tam kan sayımı değerlerinin karşılaştırılması

Toksosite	İlk tanı		*PI-Faz I		PI-Faz II		*PII-Faz I		PII-Faz II		İdame	
	GSTM	GSTT	GSTM	GSTT	GSTM	GSTT	GSTM	GSTT	GSTM	GSTT	GSTM	GSTT
HB												
Evre 0	%4.7	%8.3	-	-	-	-	%71.9	%70.0	%6.7	%10.0	-	-
Evre I	%11.6	%8.3	%25.0	%22.2	%10.3	-	%21.9	%30.0	%33.3	%50.0	%17.2	%9.1
Evre II	%39.5	%41.7	%62.5	%44.4	%51.7	%66.7	%3.1	-	%40.0	%30.0	%31.0	%36.4
Evre III	%16.3	%16.7	%12.5	%22.2	%24.1	%22.2	-	-	%20.0	%10.0	%34.5	%36.4
Evre IV	%27.9	%25.0	-	%11.1	%13.8	%11.1	%3.1	-	-	-	%17.2	%18.2
BK												
Evre 0	%80.8	%73.3	%59.4	%66.7	%10.3	-	%62.5	%70.0	%33.3	%40.0	%10.3	%9.1
Evre I	%5.8	%6.7	%15.6	%11.1	%24.1	%44.4	%12.5	-	%6.7	-	%10.3	%27.3
Evre II	%7.7	%6.7	%12.5	-	%31.0	%22.2	%25.0	%30.0	%40.0	%40.0	%24.1	%9.1
Evre III	%3.8	%13.3	%9.4	%22.2	%27.6	%33.3	-	-	%16.7	%20.0	%17.2	%27.3
Evre IV	%1.9	-	%3.1	-	%6.9	-	-	-	%3.3	-	%37.9	%27.3
ANS												
Evre 0	%34.9	%33.3	%53.1	%55.6	%10.3	%11.1	%46.9	%60.0	%40.0	%40.0	%10.3	%9.1
Evre I	%7.0	%8.3	%15.6	%11.1	%3.4	-	%18.8	-	%6.7	%10.0	%10.3	%9.1
Evre II	%14.0	%16.7	%15.6	-	%17.2	%44.4	%15.6	%20.0	%10.0	%20.0	%13.8	%18.2
Evre III	%27.9	%25.0	%9.4	%22.2	%37.9	%33.3	%15.6	%10.0	%33.3	%20.0	%20.7	%36.4
Evre IV	%16.3	%16.7	%6.2	%11.1	%31.0	%11.1	%3.1	%10.0	%10.0	%10.0	%44.8	%27.3
PLT												
Evre 0	%30.2	%25.0	%93.8	%88.9	%51.7	%22.2	%100.0	%100.0	%76.7	%80.0	%34.5	%36.4
Evre I	%9.3	%25.0	%3.1	-	%13.8	%22.2	-	-	%10.0	%10.0	-	%9.1
Evre II	%9.3	%8.3	%3.1	%11.1	%10.3	%22.2	-	-	%10.0	%10.0	%24.1	%18.2
Evre III	%41.9	%41.7	-	-	%20.7	%33.3	-	-	%3.3	-	%34.5	%27.3
Evre IV	%9.3	-	-	-	%3.4	-	-	-	-	-	%6.9	%9.1

*PI: Protokol I, PII: Protokol II

GSTM1 ve GSTT1 mutasyonu olan hastalarda ilk tanı anında Hb’de düşüklük evre II düzeyinde hastaların yaklaşık %39’unda, BK’de evre 0 düzeyinde ve ANS’de evre 0 düzeyinde düşüklük sırasıyla hastaların yaklaşık %80 ve %34’ünde, trombosit sayısında evre III düzeyinde düşüklük hastaların %41’inde izlenmiştir. Protokol I faz I aşamasında antrasiklin tedavileri sonrasında Hb’de evre II düzeyinde hastaların %44-62’sinde düşüklük, BK’de evre 0

düzeyinde hastaların %59-66'sında, ANS'de hastaların %53-55'inde evre 0 düzeyinde düşüklük, trombosit sayısında hastaların %90'ında evre 0 düzeyinde bozukluk izlenmiştir. Protokol I faz II aşamasında antrasiklin ve siklofosfamid sonrası Hb'de evre II düzeyinde hastaların %52-66'sında düşüklük, BK'de evre II-III düzeyinde hastaların %31-33'ünde, ANS'de ise hastaların %31-37'sinde evre III-IV düzeyinde düşüklük, trombosit sayısında hastaların %33-51'inde evre 0-III arasında değişen toksisite izlenmiştir. Protokol II faz I öncesi Hb'de evre 0 düzey hastaların %70-71'inde bulunurken; BK, ANS, trombositlerde evre 0 düzey sırasıyla hastaların %70, %60, %100'ünde saptanmıştır. Protokol II faz II aşamasında antrasiklin sonrası Hb'de evre I-II düzeyinde hastaların %40-50'sinde düşüklük, BK'de evre II düzeyinde hastaların %40'ında, ANS'de hastaların %33-40'ında evre 0-III arasında değişen düşüklük, trombosit sayısında hastaların %76-80'inde evre 0 düzeyinde bozukluk izlenmiştir. İdame öncesi antrasiklin ve siklofosfamid sonrası Hb, BK, ANS, trombositlerde evre III-IV düzeyinde düşüklük sırasıyla hastaların %34, %37, %44 ve %34'ünde tespit edilmiştir (Tablo 17).

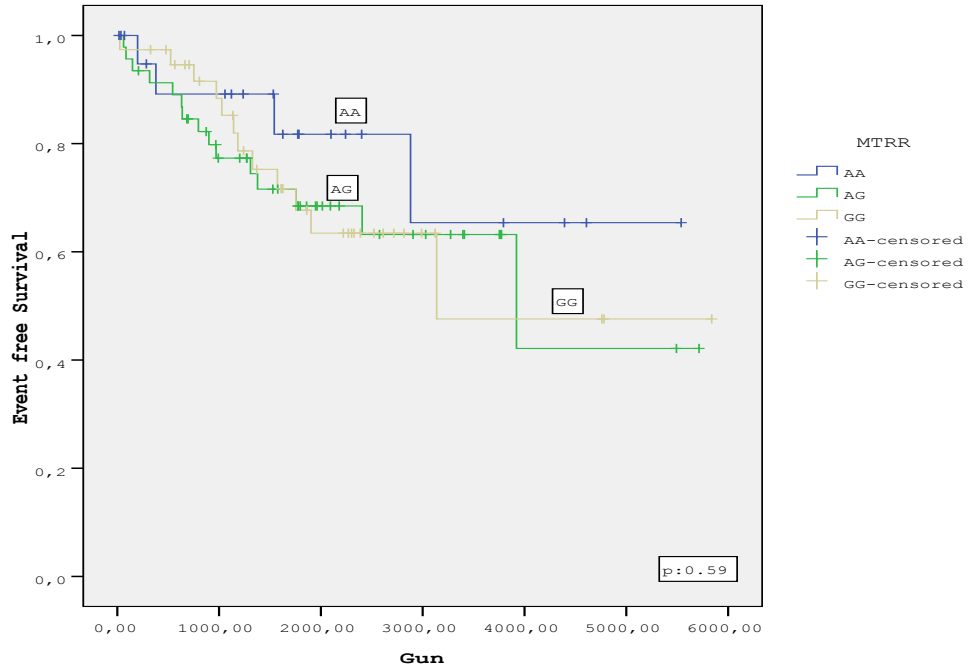
Tablo 18. GSTM1 ve GSTT1 mutasyonu olan hastalarda antrasiklin, siklofosfamid tedavisi öncesi ve sonrası kan biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması

Toksosite	İlk tanı		P-I-Faz I		P-I-Faz II		P-II-Faz I		P-II-Faz II		İdame	
	GSTM	GSTT	GSTM	GSTT	GSTM	GSTT	GSTM	GSTT	GSTM	GSTT	GSTM	GSTT
AST												
Evre 0	%65.1	%58.3	%74.2	%77.8	%82.1	%87.5	%96.3	%100.0	%57.1	%62.5	%53.8	%70.0
Evre I	%25.6	%41.7	%25.8	%22.2	%17.9	%12.5	%3.7	-	%39.3	%37.5	%38.5	%30.0
Evre II	%7.0	-	-	-	-	-	-	-	%3.6	-	%3.8	-
Evre III	%2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	%3.8	-
Evre IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALT												
Evre 0	%81.4	%83.3	%51.6	%77.8	%67.9	%75.0	%96.3	%100.0	%82.1	%100.0	%26.9	%40.0
Evre I	%14.0	%16.7	%35.5	%22.2	%25.0	%25.0	%3.7	-	-	-	%50.0	%50.0
Evre II	%4.7	-	%12.9	-	%7.1	-	-	-	%10.7	-	%7.7	%10.0
Evre III	-	-	-	-	-	-	-	-	%7.1	-	%15.4	-
Evre IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T. BİL												
Evre 0	%90.7	%91.7	%90.3	%88.9	%92.9	%100.0	%100.0	%100.0	%100.0	%100.0	%72.0	%80.0
Evre I	%4.7	%8.3	-	%11.1	%7.1	-	-	-	-	-	%20.0	%20.0
Evre II	%4.7	-	%9.7	-	-	-	-	-	-	-	%8.0	-
Evre III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Evre IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

GSTM1 ve GSTT1 mutasyonu olan hastalarda ilk tanı anında, protokol I faz I aşamasında, Protokol I faz II aşamasında antrasiklin ve siklofosfamid sonrası AST, ALT, T.bilirubinde değişim hastaların büyük çoğunluğunda evre 0 düzeyinde saptanmıştır. Protokol II faz I öncesi ve Protokol II faz II aşamasında antrasiklin sonrası AST, ALT, T.bilirubindeki bozukluk hastaların büyük çoğunluğunda evre 0 düzeyinde bulunmuştur. Az oranda bir hastada evre II-III toksisite görülmektedir. İdame öncesi antrasiklin ve siklofosfamid sonrası AST, ALT, T.bilirubinde bozulma hastaların büyük çoğunluğunda evre 0 düzeyinde bulunurken az oranda bir hastada evre II-III toksisite tespit edilmiştir (Tablo 18).

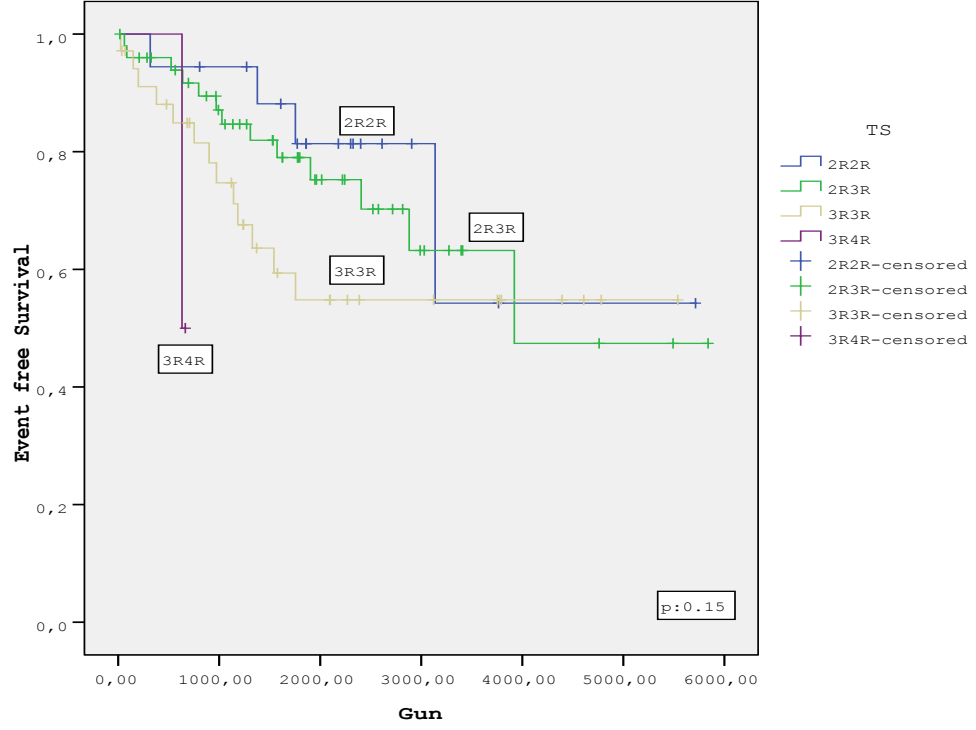
4.3. Prognoz ve Yaşam Süreleri

Çalışmaya alınan 106 hastadan 17 (%16) hasta relaps olmuş, 13 (%12) hastada ciddi (evre III veya evre IV) toksisite gelişmiştir. Toplam 12 (%11.3) hasta kaybedilmiştir. Kaybedilen olguların 6'si relaps sonrası, 6 tanesi enfeksiyon nedeniyle kaybedilmiştir. Medyan olaysız sağ kalım (EFS) 53 ay olup (0.5-192 ay) arasında değişmektedir.



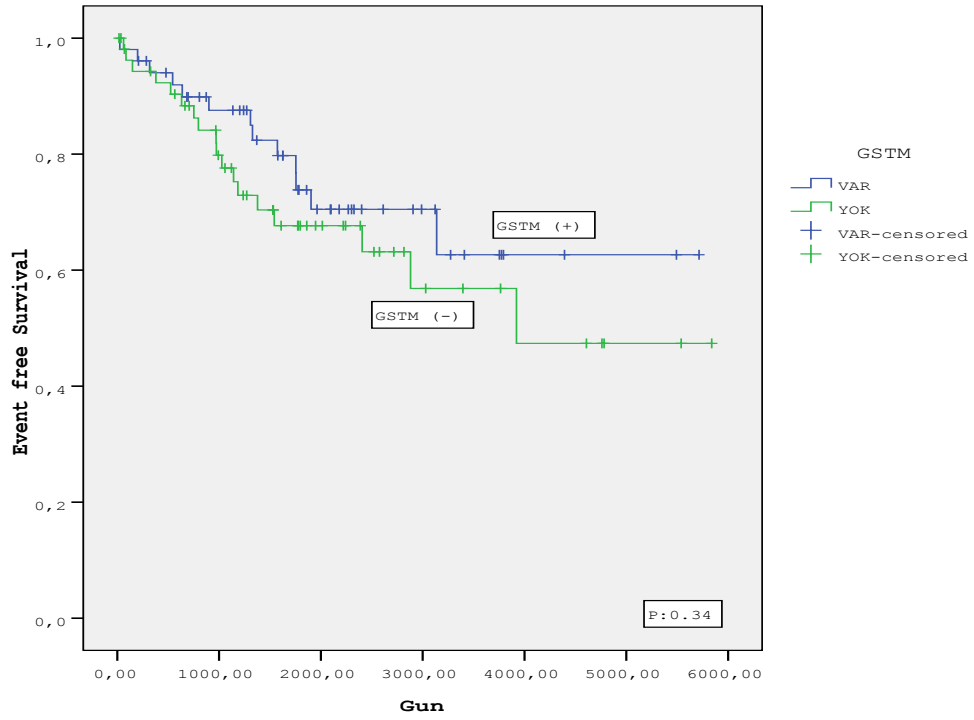
Şekil 2. MTRR gen polimorfizmine göre olaysız sağ kalım (EFS) değerlendirilmesi

MTRR gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesinde ortalama olaysız sağ kalım %70.8 olup varyantları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da en fazla olaysız sağkalımın AA varyantında (%81.8), en az sağ kalımın ise AG (%67.4) ve GG (%68.4) varyantında olduğu bulunmuştur (Şekil 2).



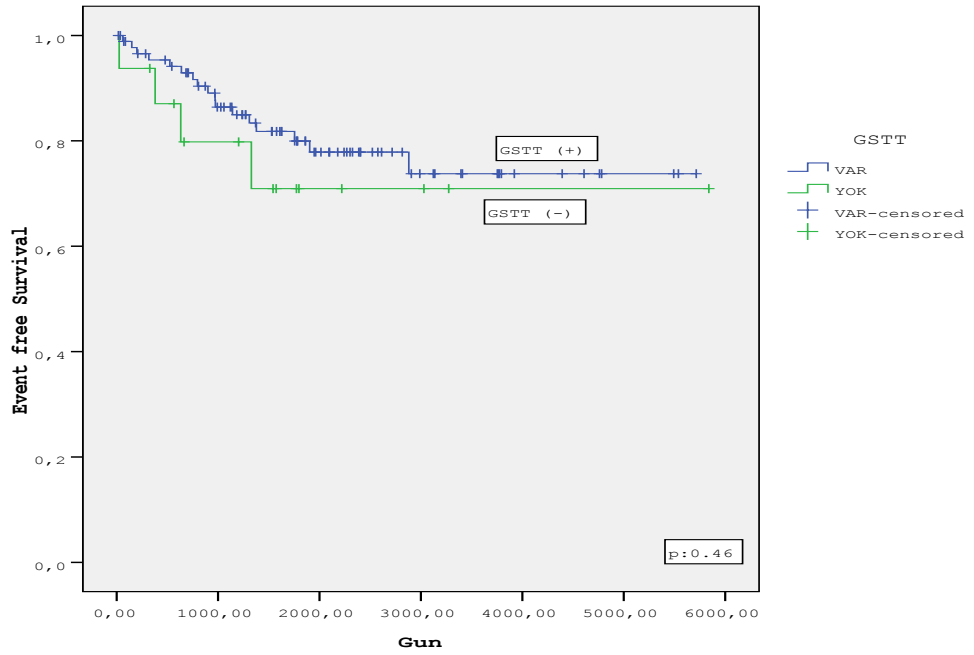
Şekil 3. TS gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesi

TS gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesinde ortalama olaysız sağ kalım %70.8 olup varyantları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da en fazla olaysız sağkalımın 2R/2R (%77.8) ve 2R/3R (%74.5) varyantlarında; en az sağ kalımın ise 3R/3R (%62.9) ve 3R/4R (%50.0) varyantında olduğu bulunmuştur (Şekil 3).



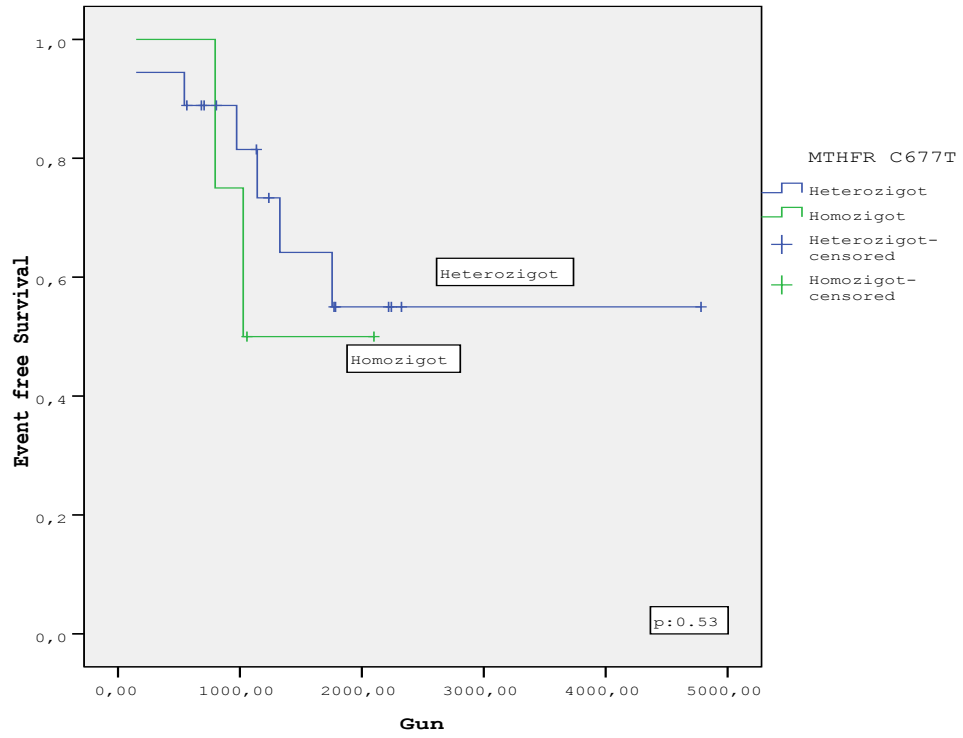
Şekil 4. GSTM gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesi

GSTM gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesinde ortalama olaysız sağ kalım %70.8 olup varyantları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da en fazla olaysız sağkalımın anlamsız genotipi taşımayanlarda (%74.5), en az sağ kalımın ise anlamsız genotipi taşıyan hastalara ait olduğu saptanmıştır (%67.3) (Şekil4).



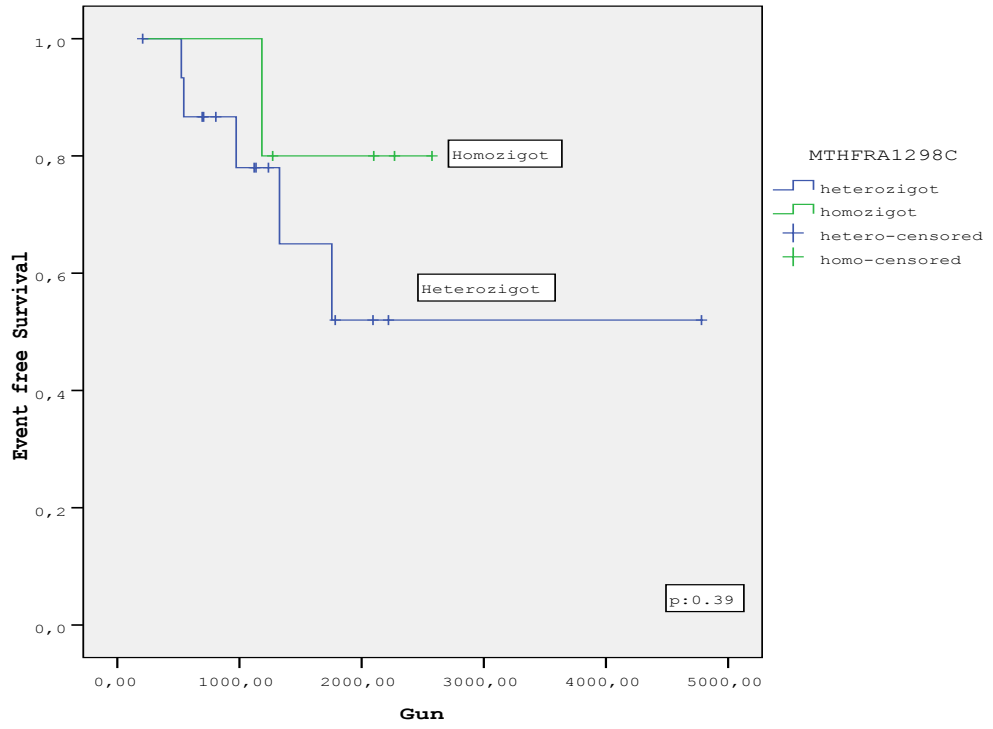
Şekil 5. GSTT gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesi

GSTT gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesinde ortalama olaysız sağ kalım %80.2 olup varyantları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da en fazla olaysız sağkalımın anlamsız genotipi taşımayanlarda (%81.1), en az sağ kalımın ise anlamsız genotipi taşıyan hastalara ait olduğu saptanmıştır (%75.0) (Şekil 5).



Şekil 6. MTHFR C677T gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesi

MTHFR C677T gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesinde ortalama olaysız sağ kalım %63.6 olup varyantları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da en fazla olaysız sağkalımın heterozigot (CT) varyantında (%66.7), en az sağ kalımın ise homozigot (TT) varyantında (%50.0) olduğu bulunmuştur (Şekil 6).



Şekil 7. MTHFR A1298C gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesi

MTHFR A1298C gen polimorfizmine göre EFS değerlendirilmesinde ortalama olaysız sağ kalım %71.4 olup varyantları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da en fazla olaysız sağkalımın homozigot (CC) varyantında (%80.0), en az sağ kalımın ise heterozigot (AC) varyantında (%68.8) olduğu bulunmuştur (Şekil 7).

Tablo 19. Gen polimorfizm tiplerinde protokolü tamamlama süreleri

	PI ilk faz	PI tüm faz	[¶] PM 2.HD MTX	[¶] PM 3.HD MTX	[¶] PM 4.HD MTX	PII ilk faz	PII tüm faz
MTRR A66G							
AA	40.2±5.6	81.9±13.4	15.9±4.8	33.6±7.5	51.8±10.2	43.4±7.2	58.5±4.8
AG	43.2±11.5	83.2±15.1	16.2±3.9	34.4±11.6	52.2±11.8	44.8±5.4	58.1±5.6
GG	48.2±16.3	89.1±12.9	17.8±5.9	37.1±10.5	55.6±11.9	48.3±13.3	63.1±12.9
TS							
2R2R	41.1±8.2	80.5±10.3	15.6±3.1	31.6±6.6	50.6±9.2	47.5±5.9	60.9±6.4
2R3R	46.7±16.7	87.7±15.2	16.5±4.1	35.5±12.1	53.1±12.4	47.7±12.4	62.3±11.8*
3R3R	43.5±7.2	84.3±13.8	18.1±6.9	37.3±9.3	56.1±11.3	42.1±5.1	56.3±4.1
MTRR-TS							
Yok	44.7±13.9	84.7±14.2	16.2±4.1*	34.4±10.3*	52.4±11.2*	46.7±10.1	60.7±9.8
Kombine	44.2±7.1	88.7±13.2	20.7±8.2*	41.3±9.9*	60.1±12.1*	40.9±5.9	56.5±4.8
GSTM1							
Var	43.8±11.1	85.1±14.1	16.5±5.3	34.1±8.1	52.3±11.4	45.6±8.8	60.1±7.5
Yok	45.6±15.2	85.5±14.4	17.2±4.6	36.7±12.6	54.7±11.7	46.2±10.7	60.1±11.1
GSTT1							
Var	44.9±13.5	85.7±12.5	16.6±4.6	34.6±9.3	53.1±10.7	46.2±10.1	60.1±9.7
Yok	43.3±8.4	82.5±21.8	17.8±6.7	39.2 ±15.6	56.3±15.9	43.9±7.7	60.3±7.2
MTHFRC677T							
AT	42.9±8.9	89.0±14.7	17.6±5.8	34.9±7.2	52.2±8.1	43.7±7.5	59.1±5.6
TT	47.2±8.7	91.7±14.8	14.1±0.1	28.1 ±0.8	53.7±12.8	44.5±6.7	55.5±8.5
MTHFRA1298C							
AC	50.5±22.7	93.4±12.9	18.6±6.1	36.5 ±7.3	52.6±8.2	43.4±7.9	59.2±5.6
CC	45.8±9.8	85.6±10.6	16.6±3.7	37.6 ±11.1	59.2±11.6	44.1±6.8	56.8±6.8

[¶] PI: Protokol I, PM: Protokol M, PII: Protokol II, HD MTX: Yüksek doz mtx. 2.HD MTX: 1. Yüksek doz MTX ile 2. Yüksek doz MTX arası geçen süre, 3.HD MTX: 1. Yüksek doz MTX ile 3. Yüksek doz MTX arası geçen süre, 4.HD MTX: 1. Yüksek doz MTX ile Protokol M bitimine kadar geçen süre; *: p<0,05

Tedavi aksama süreleri protokol M tedavisi boyunca MTRR-TS kombine homozigot varyantları bulunanlarda bulunmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı uzamıştır (p<0.05)*. Diğer polimorfizmlerde istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 19).

5. TARTIŞMA

Çocukluk çağı ALL'sinde tedavi başarısı son 20 yılda güncel kemoterapötik ilaçlarla % 80'lere ulaşmasına karşın, % 20-30 olguda halen relaps ve tedavi direnci önemli bir sorundur (1,2). Tedavi yanıtı iyi olmayan bu olgularda antilösemik ilaçların farmakodinamiğinde rol alan proteinleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin önemli rolü vardır. Bu nedenle son yıllarda araştırmalar gen polimorfizmlerin sıklığını belirleyip kemoterapi ilişkili toksisitenin ve ilaç direncinin azaltılıp sağkalım süresini arttırmaya odaklanmıştır. Biz de bu araştırmada ALL'li çocuklarda ilaç farmakodinamiğini etkileyen TS, MTRR, MTHFR ve GST enzimlerinin gen polimorfizm sıklığını belirleyip; TS, MTHFR ve MTRR'nin metotreksat tedavisi sırasında ölçülen kan düzeyleri ve GST'nin siklofosfamid toksisitesi ile ilişkisini değerlendirip, bu genlerdeki polimorfizmlerinin lösemi prognozu ile bağlantısını inceledik.

Gen polimorfizmlerinin sıklığı ırklar arasında farklılık göstermekte ve enzim tipine bağlı olarak %5-50 arasında değişmektedir (3-5). Timidilat sentaz, kemoterapotiklerin hedef aldığı proliferen hücrelerdeki DNA sentezinden sorumlu anahtar enzimdir. Sağlıklı Türk popülasyonunda TS sıklığı 2R/2R %17.6, 2R/3R %48.8, 3R/3R %33.6 oranında bulunmuştur. Timidilat sentaz 3R/3R alleli Türk popülasyonunda diğer beyaz ırklarla aynı, Japon ve Çin popülasyonuna göre ise daha az sıklıkta bulunmuştur (4). Slovenya'da 68 ALL'li ve 258 sağlıklı çocukta yapılan bir diğer araştırmada 2R/2R varyantı sağlıklı çocuklarda %30.2, ALL'li çocuklarda %25.0, 2R/3R varyantı sağlıklı çocuklarda %49.2, ALL'li çocuklarda %50.0, 3R/3R varyantı ise sağlıklı çocuklarda %20.6 iken ALL'li çocuklarda ise

%25.0 oranında bulunmuştur (11). Bizim çalışmamızda ALL’li çocuklarda TS gen polimorfizm sıklığı, sağlıklı Türk popülasyonunda bildirilen oranlarda bulundu. Sadece 2 olguda TS 3R/4R varyantı saptandı. Bu olgulardan ilki relaps ALL, kemoterapi sonrası kardiyak ve karaciğer toksisitesi nedeniyle kaybedilen bir olgu olup; diğeri yüksek minimal rezidüel lösemik yükü olması nedeniyle yüksek risk ALL-BFM kemoterapi sonrası kök hücre nakli yapılan relaps ve toksisite geliştirmeyen olgu idi. Sonuçta sadece iki olguda saptadığımız bu varyant allelin (3R/4R) hastalardaki klinik seyri değişkenlik göstermektedir.

Metionin, protein sentezinde rol alan temel bir aminoasit olup DNA metilasyonundan sorumlu MTRR enzimi sayesinde metionin üretiminin devamlılığı sağlanmış olur. Metionin sentaz redüktaz gen polimorfizm sıklığına ait en kapsamlı araştırma Slovenya’daki lösemili ve sağlıklı çocuklarda yapılmış olup MTRR 66 enziminin AA varyantı sağlıklı popülasyonda %18.2, ALL’li çocuklarda %22.1, AG varyantı sağlıklı kontrolde %52.7, ALL’li çocuklarda %52.9, GG varyantında ise sağlıklı kontrolde %29.1, ALL’li çocuklarda %25.0 oranında bulunmuştur (11). Türk popülasyonunda MTRR polimorfizm sıklığını inceleyen tek araştırma inme geçiren çocuklarda yapılmıştır. Bu çalışmada 68 sağlıklı kontrolde MTRR 66 polimorfizminin AA varyantı 22 olguda, AG varyantı 40 olguda ve GG varyantı 6 olguda pozitif bulunmuştur (43). Bizim çalışmamızda ise ALL’li çocuklarda AA varyantı %20.8, AG varyantı %43.4, GG varyantı ise %35.8 olarak saptanmıştır.

Folat yolağında 5,10-metilen-THF, 5 metil-THF’ye MTHFR enzimi aracılığı ile dönüşür. Sonuçta 5 metil-THF homosisteinden metionin sentezi için

metil grup kaynağıdır. Ülkemizden yapılan bir araştırmada MTHFR C677T gen polimorfizmi ALL’li çocuklarda heterozigot (CT) formunda %37.8, homozigot (TT) formunda %10.9 oranında bulunmuştur. MTHFR A1298C gen polimorfizmi ise ALL’li çocuklarda heterozigot (AC) formunda %51.3, homozigot (CC) formunda %19.0 oranında bulunmuştur (31). Slovenya’da lösemili ve sağlıklı çocuklardaki gen polimorfizm sıklığına ait bir araştırmada MTHFR enziminin C677T TT varyantı sağlıklı popülasyonda %14.0 sıklıkta bulunurken, ALL’li çocuklarda %7.4 oranında bulunmuştur. MTHFR A1298C CC varyantı sağlıklı popülasyonda %12.4, ALL’li çocuklarda ise %13.2 oranında tespit edilmiştir (11). Bizim araştırmamızda ALL’li çocuklarda MTHFR C677T heterozigot formu %41.8, homozigot formu ise %9.3 oranında, MTHFR A1298C heterozigot formu %37.2, homozigot formu ise %11.6 oranında saptanmıştır.

Erişkinlerde MS, MTRR gen polimorfizmlerinin ALL ve non hodgkin lenfoma (NHL)’dan koruyucu olduğu, çocuklarda ise MTHFR 677 gen polimorfizminin Fransa, Brezilya ve İngiltere’den yapılan değişik çalışmalarda sağlıklı popülasyondaki yüksek ekspresyonla lösemiden koruyucu olduğu bildirilmiştir (44-47). Bu çalışmaların aksine Hollanda, Endonezya ve Slovenya gibi ülkelerden yapılan diğer araştırmalarda ise lösemili ve sağlıklı popülasyon arasında gen polimorfizmleri açısından fark bulunmamıştır (7,11). Bizim araştırmamızda da lösemili ve daha önceki çalışmalarda bildirilen sağlıklı popülasyon arasında TS, MTRR, MTHFR ve GSTM1, GSTT1 gen polimorfizmleri açısından belirgin bir fark tespit edilmemiştir.

Glutasyon S-transferaz T ve M varyantları pek çok karsinojenik bileşenin detoksifikasyonundan sorumlu enzimler olup anlamsız genotipi olan bireylerde enzim sentezi hiç yoktur. Glutasyon S-transferaz enzimine ait GSTT1 enzimi anlamsız genotip sıklığı sağlıklı Türk popülasyonunda yapılan üç farklı araştırmada %17.3, %20.0, %21.3; GSTM1 anlamsız polimorfizm sıklığı ise üç farklı araştırmada %45.0, %51.9, %59.8 olarak belirtilmiştir (5,48-50). Glutasyon S-transferaz T1 anlamsız polimorfizmi beyaz ırkta %15.0 oranında bulunurken, Çinlilerde %64.4 ve Meksikalılarda %9.7 civarında bulunmuştur (5,40). Glutasyon S-transferaz M1 polimorfizmi ise beyaz ırkta %53.5 oranında bulunmuştur (40). Ülkemizden yapılan bir araştırmada ALL’li çocuklarda GSTT1 anlamsız genotipi %20.9, GSTM1 de %55.4 sıklıkta saptanmıştır (51). Bizim araştırmamızda ise ALL’li çocuklarda bildirilenlere benzer olarak GSTT1 anlamsız polimorfizmi %15.1 ve GSTM1 anlamsız polimorfizmi de %51.9 olarak tespit edilmiştir. Bu enzimi kodlayan GSTT1 ve GSTM1 genlerindeki polimorfizmlerin aynı zamanda kanser riski ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir. Ülkemizden bildirilen bir araştırmada kronik myeloid lösemi (KML)’li hastalarda GSTT1 genotipi taşımayan (anlamsız genotip) bireylerde KML sıklığının kontrole göre yüksek bulunması bu genotipi taşıyan bireylerde bu genin KML için koruyucu olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (52,53). Akut lösemili olgularda yapılan bir başka araştırmada ise 156 ALL’li olgu ile 94 AML’li olguda GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizm sıklığı değerlendirilmiştir. Akut lösemi gelişimine GSTM1 anlamsız varyantının katkısı olabileceği belirtilmektedir (54).

Kemoterapi toksisitesi ile gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda değişik sonuçlar bildirilmiştir. Hollanda’da ALL-9 protokolü alan 81 ALL’li çocuk hastada yüksek riskli olgular 3g/m^2 MTX ve yüksek riskli olmayan olgular 2g/m^2 MTX almakta olup mukozit geliştirme yönünden polimorfizmleri incelendiğinde MTHFR A1298C polimorfizmi olan olgularda daha az toksik etki, MTRR 66 AG ve GG varyantlarında ise daha fazla mukozit yapıcı etki bulunduğu bildirilmiştir (29). Akut lenfoblastik lösemili çocuklarda gen polimorfizmlerinin kemoterapi toksisitesi ile ilişkisinin değerlendirildiği bir derlemede MTHFR C677T polimorfizminin sınırlı sayıda olguda nörotoksik, hepatotoksik ve myelosupresif etkiye yol açtığı, MTHFR A1298C polimorfizminin ise hematolojik toksisiteye neden olduğu ve MTRR A66G polimorfizminin mukozit yapıcı etkisinin daha fazla olduğu bildirilmiştir (55). Ülkemizden yapılan bir araştırmada ALL ve NHL tanılı 37 çocukta 5g/m^2 MTX tedavisi boyunca monitörize edilen kan MTX düzeylerinin MTHFR C677T polimorfizmi taşıyan bireylerde taşımayanlara göre 24. saat kan MTX düzeyinin anlamlı olarak yüksek olduğu ancak toksik bir etkiye rastlanmadığı bildirilmiştir. Yine aynı olgularda MTHFR A1298C polimorfizmi taşıyan bireylerde taşımayanlara göre 48. saat kan MTX düzeyinin anlamlı olarak yüksek olduğu ve bu olgularda anemi, trombositopeni ve AST yüksekliği gibi toksik etkilerin geliştiği bildirilmiştir (31). Bizim araştırmamızda ise tüm olgular 4 siklus 5g/m^2 MTX almakta olup protokol M boyunca ciddi mukozit yan etkisi görülmemiştir. Ancak yüksek doz metotreksat tedavisi sonrası %5-20 oranında değişen evre III/IV myelosupresif etki, %5-10 oranında evre II/III hepatotoksik etki geliştiği ve

metotreksat duyarlılığının değerlendirildiği folat ilişkili genlerdeki polimorfizmleri (TS, TS/MTRR, MTHFR) taşıyan bireylerde kan MTX düzeylerinin taşımayanlara göre anlamlı yüksek bulunduğu ve buna bağlı olarak tedaviyi tamamlama süreleri polimorfizmi (TS/MTRR) taşımayan bireylere göre uzun sürede olduğu bulunmuştur (Tablo 8-14,19). Protokol I ve II nin 2. fazında yer alan purinetol ve thioguanin gibi antimetabolit ilaçlara bağlı toksisiteyi değerlendirdiğimizde %10-50 oranında myelosupresyona bağlı evre III/IV toksisite ve %10-20 evre II/III hepatotoksitenin geliştiği görülmüştür. Bu toksisiteden tek başına TS, MTRR ve MTHFR polimorfizmlerinden ziyade hastaların öncesinde kullandıkları antrasiklin ve siklofosfamid toksisitesinin değerlendirildiği GST polimorfizmlerinin de etkisi olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle GST anlamsız genotipi taşıyan ve taşımayan bireyler arasında protokol I ve protokol II'nin 2. fazının önce ve sonrası toksisite değerlendirilmesi ayrıca yapılmıştır. Glutasyon S-transferaz T1 ve M1 anlamsız mutasyonu taşıyan bireylerde taşımayanlara göre %5-40 oranında evre III/IV myelosupresif ve %7-15 oranında evre II/III hepatotoksik etkinin geliştiği görülmüştür. Daha önce diffüz büyük B hücreli lenfomalı 94 çocuğun değerlendirildiği bir araştırmada GSTT1 anlamsız genotipi varlığına bağlı evre III/IV lökopeni, ateş ve mukozit toksisitesi geliştiği GSTT1 ve GSTM1 kombine mutasyonlarında ise evre III/IV trombositopenin geliştiği bildirilmiştir (39). Sistemik lupus eritematozis'li hastalarda ortalama 1g/m² değişen dozlarda tek başına siklofosfamid kullanıldığı olgularda myelosupresif, intestinal toksisite ve enfeksiyon açısından GST enzimine ait her iki polimorfik allel (GSTT1,GSTM1) açısından anlamlı fark

bulunmamıştır (38). Lösemi protokolünde 1g/m^2 siklofosfamid alan çocuklarda cyt p450, GST ve diğer gen polimorfizmlerinin varlığı ile mukozit, hemorajik sistit ve karaciğer toksisite gelişimi arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu polimorfizmler içinde CYT P450 ailesinden CYP 2B6 enziminin gen polimorfizmini taşıyan bireylerde mukozit, hemorajik sistit ve karaciğer toksisite (venookluziv hastalık) gelişiminin yüksek olduğu bulunmuştur (56).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda maliyn hücrelerin de normal hücreler gibi aynı germline genetik polimorfizmler taşımasına rağmen maliyn hücrelerin artmış genetik instabilitesi nedeniyle kanser hücrelerinin biyolojik karakterinde de değişikliğe yol açarak ilaç direncine neden olduğu bildirilmektedir. Timidilat sentaz, MTRR, GST ve MTHFR enzimlerinde saptanan gen polimorfizmlerinin akut lösemilerde relaps veya rezistans gelişimine neden olduğu veya önlediğine ilişkin değişik araştırmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir (3,6-12). Akut lenfoblastik lösemili çocuklarda kullanılan yüksek doz metotreksat bir folat antagonisti olup folat metabolizmasında rol alan enzimlerin kodladığı genlerdeki polimorfizmler metotreksat gibi folat bazlı kemoterapotik ajanların duyarlılığını etkilemektedir. Son yıllarda metotreksat etkinlik ve toksisitesinin değerlendirildiği araştırmalarda folat ilişkili enzimlerden TS, MTRR ve MTHFR ile pek çok araştırma yapılmıştır. Bu enzimler içinde DNA sentezinden sorumlu timidilat sentaz geninde saptanan 3R/3R polimorfizminde, 2R/3R veya 2R/2R genotiplerine göre enzim aktivitesi daha yüksek olduğu için MTX etkisi azalmakta veya ilaç direnci artmaktadır. Bu durumun lösemnin prognozunu olumsuz etkilediği ve uzun süre olaysız yaşam süresinin yabancı tipe göre daha

kısa olduğu bildirilmiştir (6,12,32,33). Dana Farber kanser enstitüsünden yapılan bir araştırmada, 12 yıllık bir izlem süresince izlenen 205 ALL’li çocuğun 32’sinde relaps ve/veya ölüm gelişmiş, bu olguların büyük kısmında TS 3R/3R varyantı saptanmıştır (12). Yine St. Jude kanser merkezinden yapılan bir araştırmada 246 ALL’li çocukta yüksek riskli olgularda TS 3R/3R polimorfizmi varlığı hematolojik relaps yönünden anlamlı bulunmuştur (3). Almanya’da BFM grubundan yapılan bir diğer araştırmada ise ALL BFM 86-90 kemoterapisi alan 40 relaps olguda olaysız sağ kalım yönünden TS 3R/3R varyantı ile TS 2R/3R varyantı arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır. Dana Farber grubunun tek sefer 4 g/m² MTX ve St. Jude grubunun 2 gr/m² MTX uygularken, Alman grubu 5 g/m² toplam 4 siklusta vermişlerdir. Alman grubunda hastaların relaps riskinin Dana Farber ve St. Jude grubuna göre fazla olmayışı, Alman grubunda kullanılan yüksek doz MTX’in TS 3R/3R’ye bağlı artmış enzim aktivitesinin üstesinden gelip yeterli konsantrasyona ulaşabilmesine bağlı olabileceği şeklinde yorumlamışlardır (3,57). Bizim araştırmamızda da TS 3R/3R polimorfizmi taşıyan hastaların MTX kan düzeylerinin farklı siklularda ve farklı saatlerde TS 3R/3R polimorfizmi taşımayanlara göre yüksek olması ayrıca EFS’ler açısından her iki grup arasında fark bulunmaması da bu düşüncüyü desteklemektedir. DNA metilasyonundan sorumlu MTRR A66G gen polimorfizmi de metilasyon yolağının düzgün çalışmamasına, DNA hipometilasyon ya da dismetilasyonuna yol açarak hücrenin karsinogenezis riskini arttırmaktadır. Metionin sentaz redüktaz, metionin sentaz enziminin aktif kofaktörü olup, MTRR’de polimorfizm

varlığının homosisteinin remetilasyonunu önleyerek artışına ve folat seviyesinde düşüklüğe yol açarak ALL riskinde artışa neden olduğu bildirilmektedir (34).

Bizim araştırmamızda da TS, MTRR ve MTHFR polimorfizmi taşıyan ve taşımayanlar normal popülasyonla benzer sıklıkta bulunmuş ve EFS açısından fark bulunmamıştır.

Akut lenfoblastik lösemili çocuklarda tedavi başarısını etkileyen diğer gen polimorfizmleri GSTM ve GSTT anlamsız genotipi olup St. Jude merkezinden yapılan bir araştırmada GSTM1 ve GSTT1 anlamsız genotipi taşıyan ALL’li çocuklar ile taşımayanlar arasında hastalıksız yaşam süresi açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (40). Bu çalışmanın aksine diğer çalışmalarda olaysız sağ kalım ve relaps yönünden sonuçlar oldukça değişkendir. Örneğin; Stanullo ve ark.’nın araştırmasında ALL’li çocuklarda GSTT1 ve GSTM1 anlamsız genotipi taşıyan bireylerde relaps riskinin düşük olduğu belirtilmiş ancak Takanashi ve ark. ise ALL’li çocuklarda yaptıkları araştırmada relaps riskinin yüksek olduğunu ve EFS’nin düşük olduğunu bildirmişlerdir (58,59). Bizim araştırmamızda ise GSTT1 ve GSTM1 anlamsız genotipi taşıyan bireylerle taşımayanlar arasında relaps riski ve EFS yönünden fark bulunmamıştır. Az sayıda olgunun değerlendirildiği araştırmamızda bu sonuç kombine kemoterapötiklerin etkin olduğunu buna karşılık fazla sayıda olgunun değerlendirildiği ileri araştırmalara da gereksinim olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak TS, MTRR, MTHFR, GSTM1 ve GSTT1 enzimlerine ait gen polimorfizm sıklığı ALL’li çocuklarda normal sağlıklı popülasyonda görüldenden farklı bulunmamıştır. TS, MTRR ve MTHFR enzimlerinin etkilediği esas ilaç

metotreksat olup protokol gereği uygulanan MTX kan düzeyleri gen polimorfizmini homozigot olarak taşıyanlarda taşımayanlara göre yüksek, tedaviyi tamamlama süreleri uzun bulunmasına karşılık EFS ve relaps riski yönünden iki grup arasında fark bulunmamıştır. Bu da BFM-95 protokolünde uygulanan yüksek doz metotreksatın polimorfizme bağlı gelişen ilaç direncini kırmada etkin bir doz olduğunu desteklemektedir. Antrasiklin ve siklofosfamid tedavileri sonrası etkinliğin değerlendirildiği GST enzimine ait M1 ve T1 varyantlarını taşıyan bireylerde taşımayanlara göre myelotoksik etkinin ileri evrelere ulaşabildiği görülmüştür. Lösemili çocuklarda genetik polimorfizmlerin önceden belirlenmesi ve kemoterapötiklerin bunlara göre düzenlenmesini tanımlayan bireyselleştirilmiş tedavi olaysız sağkalım başarısını arttıracak ve uzun dönem yan etkileri de azaltabilecektir.

6. SONUÇLAR

Bu araştırmada akut lenfoblastik lösemili çocuklarda ilaç farmakodinamiğini etkileyen TS, MTRR, MTHFR ve GST enzimlerinin gen polimorfizm sıklığı; TS, MTHFR ve MTRR'in metotreksat tedavisi sırasında ölçülen kan düzeyleri ve GST'in siklofosamid toksisite ile ilişkisi ve bu genlerdeki polimorfizmlerinin lösemi prognozu ile bağlantısını inceledik.

Çalışmamızda ALL'li çocuklarda TS gen polimorfizm sıklığı, sağlıklı Türk popülasyonunda bildirilen oranlarda bulundu. Sadece 2 olguda daha önce bildirilmeyen TS 3R/4R varyantını saptandı. İki olguda saptadığımız 3R/4R allelinin hastalardaki klinik seyri değişkenlik göstermekteydi.

Araştırmamızda ALL'li çocuklarda MTRR A66G AA varyantı %20.8, AG varyantı %43.4, GG varyantı ise %35.8 olarak saptandı.

ALL'li çocuklarda MTHFR C677T heterozigot formu %41.8, homozigot formu ise %9.3 oranında, MTHFR A1298C heterozigot formu %37.2, homozigot formu ise %11.6 oranında saptandı.

GSTT1 anlamsız polimorfizmi %15.1 ve GSTM1 anlamsız polimorfizmi de %51.9 olarak tespit edildi.

Hastalarda 4 farklı siklus için bakılan kan metotreksat düzeylerinin MTRR GG gen polimorfizminin olup olmamasına göre yapılan karşılaştırılmasında kan metotreksat düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Timidilat sentaz enzimi 3R/3R gen polimorfizminin olup olmamasına; hem TS 3R/3R hem de MTRR GG gen polimorfizminin olup olmamasına; MTHFR C677T TT gen polimorfizminin olup olmamasına ve MTHFR A1298C

CC gen polimorfizminin olup olmamasına göre yapılan karşılaştırılmasında farklı siklusların farklı saatlerinde metotreksat düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Yüksek doz metotreksat tedavisi sonrası TS, MTRR ve MTHFR gen polimorfizmi homozigot olan hastalarda %5-20 oranında değişen evre III/IV myelosupresif etki, %5-10 oranında evre II/III hepatotoksik etki geliştiği görüldü.

Tedavi aksama süreleri protokol M tedavisi boyunca MTRR-TS kombine varyantları bulunanlarda bulunmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı uzamış saptandı. Diğer polimorfizm varyantlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı.

Protokol I ve II nin 2. fazında yer alan purinetol ve thioguanin gibi antimetabolit ilaçlara bağlı toksisiteyi değerlendirdiğimizde Timidilat sentaz, MTRR ve MTHFR gen polimorfizmi homozigot olan hastalarda %10-50 oranında myelosupresyona bağlı evre III/IV toksisite ve %10-20 evre II/III hepatotoksitenin geliştiği görüldü.

Protokol I ve protokol II'nin 2. fazının önce ve sonrası toksisite değerlendirilmesinde; GST T1 ve M1 anlamsız mutasyonu taşıyan bireylerde taşımayanlara göre %5-40 oranında evre III/IV myelosupresif ve %7-15 oranında evre II/III hepatotoksik etkinin geliştiği görüldü.

Çalışmamızda TS, MTRR, GSTT1, GSTM1 ve MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmi taşıyan ve taşımayanlar arasında EFS açısından fark bulunmadı.

Antrasiklin ve siklofosfamid tedavileri sonrası etkinliğin değerlendirildiği GST enzimine ait M1 ve T1 varyantlarını taşıyan bireylerde taşımayanlara göre

EFS ve relaps yönünden fark bulunmasa da myelotoksik etkinin ileri evrelere ulaşabildiği görüldü. Timidilat sentaz, MTRR ve MTHFR enzimlerinin gen polimorfizmini homozigot olarak taşıyanlarda taşımayanlara göre relaps riski yönünden fark bulunmadı.

7. ÖZET

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ ÇOCUKLARDA KEMOTERAPİ İLİŞKİLİ ENZİMLERDEKİ GEN POLİMORFİZM SIKLIĞI VE PROGNOZA ETKİSİ

Son yıllarda lösemi tedavi başarısını etkileyen faktörlerden biri olarak kemoterapi ilişkili enzimlerdeki gen polimorfizmleri ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmada ALL BFM-95 kemoterapi protokolü alan 106 lösemili çocukta timidilat sentaz (TS), metionin sentaz redüktaz (MTRR), metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) ve glutatyon sentaz-transferaz (GST) enzimlerine ait gen polimorfizm sıklığını, bu polimorfizmlerin ilaç metabolizması üzerindeki etki ve yan etkileri ayrıca prognoz ile bağlantısı incelendi.

Sonuçlarımız TS, MTRR, MTHFR ve GST enzimlerine ait polimorfizm sıklığının sağlıklı Türk popülasyonundaki polimorfizm sıklığına benzer oranlarda olduğunu göstermiştir. Folat bazlı kemoterapötik ilaçların metabolizması üzerine etkili polimorfizmlerden TS, MTRR ve MTHFR enzimlerine ait polimorfik allellere sahip hastalarda yüksek doz metotreksat sonrası evre II-IV arası myelotoksik ve hepatotoksik yan etkilerin geliştiği tespit edilmiştir. Buna karşılık TS 3R/3R alleli taşıyan ve taşımayanlar arasında olaysız sağ kalım yönünden fark bulunmaması 3R/3R alleleline bağlı artmış enzim aktivitesini bloke edecek dozda yüksek doz metotreksat uygulanmasının etkin olduğunu göstermektedir. Protokol 1 ve 2 tedavisinin 2. fazında uygulanan siklofosfamid önce ve sonrası toksisite değerlendirmesinde GSTT1 ve GSTM1 anlamsız genotipini taşıyan bireylerde taşımayanlara göre ileri evre myelotoksik ve hepatotoksik yan etkiler geliştiği

görülmüştür. Yine GSTT1 ve GSTM1 polimorfik allelleri olan hastalarda olmayanlara göre aralarında olaysız sağ kalım yönünden istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

ALL BFM-95 protokolü gereği hastalara uygulanan yüksek doz kombine kemoterapötiklerin tedavilere yanıtı enzim tipine göre değişkenlik göstermektedir. Varyant allel varlığında uygulanan yüksek doz kemoterapötikler ilaç direncini yenmek için istenen doz aralığında iken varyant alleli taşımayan bireyler için toksik düzeyde kalabilmektedir. Gelecekte gen polimorfizmlerinin önceden belirlenmesi bireyselleştirilmiş tedavi ile lösemili hastalarda olaysız sağ kalım başarısını arttıracaktır.

Anahtar kelimeler: Lösemi, kemoterapi, gen polimorfizmi

8. SUMMARY

THE FREQUENCY AND EFFECT ON PROGNOSIS OF GENE POLYMORPHISMS IN CHEMOTHERAPY RELATED ENZYMES IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Recent studies have suggested that polymorphisms in genes coding the proteins involved in the pharmacodynamics of antileukemic agents may effect therapy success. The aims of this study were to determine the frequency of gene polymorphisms and to evaluate its correlations with efficacy and side effects in 106 children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) who received BFM-95 chemotherapy.

We found that thymidylate synthase (TS), methionine synthase-reductase (MTRR), methylenetetrahydrofolate-reductase (MTHFR) and glutathione synthase-transferase (GST) polymorphisms in children with ALL were similar to the proportions of healthy Turkish population. Grade II/IV myelotoxicity and hepatotoxicity developed after high dose methotrexate in patients with TS, MTRR, MTHFR polymorphic alleles. There was no significant difference in the event free survival (EFS) between the ones who carried TS 3R/3R allele or not; which indicates that high dose MTX can overcome the increased TS enzyme activity due to 3R/3R allele. Furthermore, we found advanced myelotoxicity and hepatotoxicity in patients with GSTT1/GSTM1 null genotype in the second phase of protocol I and II. We didn't find any statistically difference in terms of EFS between the patients with or without GSTT1, GSTM1 null genotype.

Treatment response of patients who received BFM-95 chemotherapy show variability according to the enzyme type. Although high dose chemotherapy may overcome drug resistance due to variant polymorphic allele, it may cause toxicity for patients who do not carry variant polymorphic alleles. As a result, we believe that personal gene polymorphism identifications concomitant with the drug dosage adjustments before therapy may increase EFS in the future.

Key Words: Leukemia, chemotherapy, gene polymorphism

9. KAYNAKLAR

1. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, et al. Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995, National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub. No. 99-4649. Bethesda, MD, 1999.
2. Pui CH, Boyett JM, Rivera GK, et al. Long term results of Total Therapy studies 11, 12 and 13A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St. Jude Children's Research Hospital. *Leukemia* 2000;14:2286-2294.
3. Rocha JC, Cheng C, Liu W, Kishi S, Das S, Cook EH, et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;105:4752-4758.
4. Süzen HS, Yüce N, Güvenç G, Duydu Y, Erke T. TYMS and DPYD polymorphisms in a Turkish Population. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61:881-885.
5. Oke B, Akbas F, Aydin M, Berkan H. GSTT1 null genotype frequency in a Turkish population. *Arch Toxicol* 1998;72:454-455.
6. Dulucq S, St-Onge G, Gagné V, Ansari M, Sinnott D, Labuda D, et al. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood* 2008;111:3692-3700.
7. Giovannetti E, Ugrasena DG, Supriyadi E, Vrolijk L, Azzarello A, de Lange D, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and

thymidylate synthase promoter (TSER) polymorphisms in Indonesian children with and without leukemia. *Leuk Res* 2008;32:19-24.

8. Da Silva Silveira V, Canalle R, Scrideli CA, Queiroz RG, Bettiol H, Valera ET, et al. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and DNA repair genes and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2009;33:898-901.
9. D'Angelo V, Ramaglia M, Iannotta A, Crisci S, Indolfi P, Francese M, et al. Methotrexate toxicity and efficacy during the consolidation phase in paediatric acute lymphoblastic leukaemia and MTHFR polymorphisms as pharmacogenetic determinants. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;68:1339–1346.
10. 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;113:2284-2289.
11. Petra BG, Janez J, Vita D. Gene-gene interactions in the folate metabolic pathway influence the risk for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leuk Lymphoma* 2007;48:786-792.
12. Krajcinovic M, Costea I, Chiasson S. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2002;359:1033-1034.

13. Poplack DG. Acute lymphoblastic leukemia. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and practice of pediatric oncology. 2nd ed. Philadelphia:J.B. Lippincott, 1993;431-483.
14. Redner A. Leukemias. In: Lanzkowsky P editor. Manuel of Pediatric Hematology and Oncology. 3rd ed. San Diego, California: Academic Pres, 2000;359-380.
15. Kaya Z. Akut lenfoblastik lösemili çocuklarda BFM 95 protokolünün böbrek fonksiyonları üzerindeki yan etkileri. Yandal Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi,2005
16. Kebudi R. Pediatric Oncology in Turkey. J Pediatr Hematol Oncol 2012;34:12-14
17. Greaves MF. Aetiology of acute leukemia. Lancet 1997;349:344-349.
18. Pui CH, Camoana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia-current status and future perspectives. Lancet Oncol 2001;10:597-607.
19. Behm FG. Morphologic and cytochemical characteristics of childhood lymphoblastic leukemia. Hem Oncol Clin North Am 1990;4:715-743.
20. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operatice group. Br J Haematol 1976;33:451-458.
21. Catovsky D, Tavares de Castro J. The classification of acute leukaemia (AL) and its clinical significance. Schweiz Med Wochenschr 1983;113:1434-1437.

22. Kocak U, Gursel T, Kaya Z, Aral YZ, Albayrak M, Keskin EY, et al. ALL-BFM 95 treatment in Turkish children with acute lymphoblastic leukemia--experience of a single center. *Pediatr Hematol Oncol* 2012;29:130-140.
23. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 2000;95:3310-3322
24. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: Results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 2001;97:1211-1218.
25. Bowman WP, Larsen EL, Devidas M, Linda SB, Blach L, Carroll AJ et al. Augmented therapy improves outcome for pediatric high risk acute lymphocytic leukemia: results of Children's Oncology Group trial P9906. *Pediatr Blood Cancer* 2011;57:569-577.
26. Landier W, Bhatia S. Late Complications of hematologic diseases and their therapies. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, Heslop H, editors. *Hematology Basic Principles and Practice*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier, 2009;1539-1552.
27. Bör Ö. Kemoterapötik Ajanlar. Anak S, Aydoğan G, Cetin M, Irken G, Kemahlı S, Ozturk G, Yeşilipek MA editörler. *Pediyatrik Hematoloji*. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2011;743-750.

28. Neville KA, Leeder JS. Pediatric Pharmacogenetics, Pharmacogenomics and Pharmacoproteomics. In: Kliegman RM, Stanton BF, St. Geme III JW, Schor NF, Behrman RE editors. Nelson Textbook of Pediatrics. 19th ed. Philadelphia: Elsevier, 2011; p. 250
29. Huang L, Tissing WJ, De Jonge R, Van Zelst BD, Pieters R. Polymorphisms in folate-related genes: association with side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008;22:1798–1800.
30. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30:445–600.
31. Kantar M, Kosova B, Cetingul N, Gumus S, Toroslu E, Zafer N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene polymorphisms and therapy-related toxicity in children treated for acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2009;50:912–917.
32. Krajcinovic M, Costea I, Primeau M, Dulucq S, Moghrabi A. Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis. *Pharmacogenomics J* 2005;5:374–380.
33. Costea I, Moghrabi A, Krajcinovic M. The influence of cyclin D1 (CCND1) 870A>G polymorphism and CCND1-thymidylate synthase (TS) gene-gene

- interaction on the outcome of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics* 2003;13:577-580.
34. De Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD, Jansen G, van Zantwijk CH, Kaspers GJ, et al. Effect of polymorphisms in folate related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;106:717-720.
 35. Meissner B, Stanulla M, Ludwig WD, et al. The GSTT1 deletion polymorphism is associated with initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18:1920-1923.
 36. Meeker ND, Yang JJ, Schiffman JD. Pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11:1621-1632.
 37. Parekh HK, Sladek NE. NADPH-dependent enzyme-catalyzed reduction of aldophosphamide, the pivotal metabolite of cyclophosphamide. *Biochem Pharmacol* 1993;46:1043–1052.
 38. Zhong S, Huang M, Yang X, Liang L, Wang Y, Romkes M. et al. Relationship of glutathione S-transferase genotypes with side-effects of pulsed cyclophosphamide therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Clin Pharmacol* 2006;62:457–472.
 39. Cho HJ, Eom HS, Kim HJ, Kim IS, Lee GW, Kong SY. Glutathione-S-transferase genotypes influence the risk of chemotherapy-related toxicities and prognosis in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;198:40–46.

40. Chen CL, Liu Q, Pui CH, Rivera GK et al. Higher frequency of Glutathione S Transferase deletations in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;89:1701-1707.
41. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003;47:7369-7375.
42. Kishi S, Yang W, Boureau B, Morand S, Das S, Chen P, et al. Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103:67–72.
43. Akar N, Akar E, Ozel D, Deda G, Sipahi T. Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke. *Thromb Res* 2001;102:115-120.
44. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4004-4009.
45. Franco RF, Simões BP, Tone LG, Gabellini SM, Zago MA, Falcão RP. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;115:616-618.
46. Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard E, Theoret Y, Moghrabi A, et al. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the

- susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103:252-257.
47. Gemmati D, Ongaro A, Scapoli GL, Della Porta M, Tognazzo S, Serino ML, et al. Common gene polymorphisms in the metabolic folate and methylation pathway and the risk of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:787-794.
 48. Kadioglu E, Kocabas NA, Demircigil GC, Coskun E, Ozcagli E, Durmaz E, et al. Assessment of individual susceptibility to baseline DNA and cytogenetic damage in a healthy Turkish population: evaluation with lifestyle factors. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012;16:1157-1164.
 49. Kocabaş NA, Karahalil B, Karakaya AE, Sardaş S. Influence of GSTM1 genotype on comet assay and chromosome aberrations after induction by bleomycin in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 2000;469:199-205.
 50. Ada AO, Süzen SH, Iscan M. Polymorphisms of cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferases M1 and T1 in a Turkish population. *Toxicol Lett* 2004;151:311-315.
 51. Balta G, Yuksek N, Ozyurek E, Ertem U, Hicsonmez G, Altay C, et al. Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *Am J Hematol* 2003;73:154-160.

52. Taspinar M, Aydos SE, Comez O, Elhan AH, Karabulut HG, Sunguroglu A. CYP1A1, GST gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukemia. *Swiss Med Wkly* 2008;138:12-17.
53. Özten N, Sunguroğlu A, Bosland MC. Variations in glutathione-S-transferase genes influence risk of chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol.* 2012;30:150-155.
54. Aydin-Sayitoglu M, Hatirnaz O, Erensoy N, Ozbek U. Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias. *Am J Hematol.* 2006;81:162-170.
55. Gervasini G, Vagace JM. Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Front Genet* 2012;3:249.
56. Rocha V, Porcher R, Fernandes JF, Filion A, Bittencourt H, Silva W Jr, et al. Association of drug metabolism gene polymorphisms with toxicities, graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for patients with leukemia. *Leukemia.* 2009;23:545-556.
57. Lauten M, Asgedom G, Welte K, Schrappe M, Stanulla M. Thymidylate synthase gene polymorphism and its association with relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003;88:353-354.
58. Stanulla M, Schrappe M, Brechlin AM, et al. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse

in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood* 2000;95:1222-1228.

59. Takanashi M, Morimoto A, Yagi T, Kuriyama K, Kano G, Imamura T, et al. Impact of glutathione S-transferase gene deletion on early relapse in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2003;88:1238-1244.

10. EKLER

Ek 1. ALL BFM 95 protokol I tedavi şeması

Kemoterapötikler	Doz	Günler
Prednisolon	60 mg/m ² /gün oral	1. günden 29. güne kadar
Vinkristin	1.5 mg/m ² /gün i.v	8, 15, 22, 29. günler
Daunorubicin	30 mg/m ² /gün i.v	8, 15, 22, 29. günler
L-Asparajinaz	5000 Ü/m ² /gün i.v	12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33. günler
Siklofosfoamid	1000 mg/m ² /gün i.v	36 ve 64. gün
Sitozin arabinozid	75 mg/m ² /gün i.v	38-41, 45-48, 52-55, 59-62. günler arası
6-Merkaptopurin	60 mg/m ² /gün oral	36. günden 64. güne kadar

Ek 2. ALL BFM 95 protokol M tedavi şeması

Kemoterapötikler	Doz	Günler
6-Merkaptopurin	25 mg/m ² /gün oral	1. günden 56. güne kadar
Metotreksat	5 gr/m ² /gün i.v	8, 22, 36, 50. günler
Lecuvorin rescue*	15 mg/m ² /gün i.v	9, 23, 37, 51. günler

* Lecuvorin rescue:Metotreksat tedavisinin 42. saatinde başlanır. Metotreksat seviyesine göre 6 saat aralıklarla tekrarlanır.

Ek 3. ALL BFM 95 protokol II tedavi şeması

Kemoterapötikler	Doz	Günler
Dexametazon	10 mg/m ² /gün oral	1. günden 21. güne kadar
Vinkristin	1.5 mg/m ² /gün i.v	8, 15, 22, 29. günler
Doxorubicin	30 mg/m ² /gün i.v	8, 15, 22, 29. günler
L-Asparajinaz	10000 Ü/m ² /gün i.v	8, 11, 15, 18. günler
Siklofosfoamid	1000 mg/m ² /gün i.v	36. gün
Sitozin arabinozid	75 mg/m ² /gün i.v	38-41, 45-48. günler arası
6-Thioguanin	60 mg/m ² /gün oral	36. günden 49. güne kadar

Ek 4. ALL BFM 95 idame tedavi şeması*

Kemoterapötikler	Doz	Günler
6-Merkaptopurin	50 mg/m ² /gün oral	1-70. günler arası devamlı
Metoreksat	20 mg/m ² /hafta oral	1-70. günler arası haftada bir
Vinkristin	1.5 mg/m ² /gün i.v	57. ve 63. gün
Dexametazon	6 mg/m ² /gün oral	57-63. günler arası devamlı

* İdame tedavi şeması toplam 6 siklus uygulanmalıdır. Böylece toplam tedavi kız çocuklarda 104 hafta, erkek çocuklarda 156 haftaya tamamlanır.

Ek 5. Dünya Sağlık Örgütü Toksisite Kriterleri-1

Derece	0	1	2	3	4
Genel durum	Normal aktivite	Hafif etkilenme	Yaşa uygun aktivitede anlamlı kısıtlanma	Yatağa bağımlı, bakıma muhtaç	Yoğun müdahale, ağır hasta
Hematolojik Toksisite					
Hb (g/dl)	Yaşa g. N	10.0 - N	8.0 - 10.0	6.5 - 8.0	< 6.5
Lökosit (G/l)	≥ 4.0	3.0 - 4.0	2.0 - 3.0	1.0 - 2.0	< 1.0
Granülosit (G/l)	≥ 2.0	1.5 - 2.0	1.0 - 1.5	0.5 - 1.0	< 0.5
Trombosit (G/l)	≥ 100	75 - 100	50 - 75	10 - 50	< 10
Enfeksiyöz Toksisite					
Enfeksiyon	Yok	Hafif	Ajan yok: iv-AB	Ajan: iv-AB	Septik şok
Ateş (°C)	< 38	38-39	39-40	<24 sa. > 40	≥24 sa. > 40
GİS Toksisitesi					
Bulantı	Yok	Beslenme yeterli	Beslenmede belirgin azalma	Hemen hemen hiç beslenememe	TPN gerekli
Kusma (24 saatte)	0	1	2-5	6-10	>10 / TPN gerekli
Stomatit	Yok	Ağrısız ülser, eritem	Ağrılı ülser, yiyebiliyor	Ağrılı ülser, yiyemiyor	Stomatitten dolayı TPN gerekli
Karında ağrı/kramp	Yok	Hafif ağrılar, fonksiyonda kısıtlanma yok	Orta şiddette ağrılar: ağrılar ya da analjezikler fonksiyonda kısıtlılık yapıyor, ama günlük hayatta kısıtlanma olmuyor	Ağır ağrılar: ağrılar ya da analjezikler günlük hayattaki aktiviteleri belirgin şekilde kısıtlıyor	Ağır şekilde engelleyici özellikte ağrılar
Gastrit	Yok	-	Tıbbi yaklaşım gerekli ya da non-cerrahi müdahale	Ayaktan kontrol edilemiyor, yatış ya da cerrahi gerekli	Acil cerrahiye gerekli kılan, yaşamı tehdit eden kanama
Mide ülseri (radyolojik veya endoskopik tanı gerekli)	Yok	-	Tıbbi yaklaşım gerekli ya da non-cerrahi müdahale	Perforasyonsuz kanama, ayaktan kontrol edilemiyor, yatış ya da cerrahi gerekli	Acil cerrahiye gerekli kılan perforasyon ya da kanama
Melena / GİS kanaması	Yok	Transfüzyonsuz hafif	-	Transfüzyon gerekli	Ağır kanama, elektif olmayan majör müdahale gerekli
İshal (dışkı sayısı/gün)	Yok	2-3	4-6 veya gece dışkılama veya hafif karın krampı	7-9 veya inkontinans veya şiddetli kramp	≥10 veya kanlı ishal veya TPN gerekli
S-lipaz	Yaşa g. N	N - 1.5 X N	1.5 - 2.0 X N	2.0 - 5.0 X N	> 5.0 X N
S-amilaz	Yaşa g. N	N - 1.5 X N	1.5 - 2.0 X N	2.0 - 5.0 X N	> 5.0 X N
Pankreas USG	Yaşa g. N	-	Ekojenitede lokal artış	Ekojenitede genel artış	Psödokist, kanama
S-glukoz (mg/dl)	Yaşa g. N	N - 160	160 - 250	250. - 500	>500 veya asidoz
S-bilirubin	Yaşa g. N	N - 1.5 X N	1.5 - 3.0 X N	3.0 - 10.0 X N	>10.0 X N
AST/ALT	Yaşa g. N	N - 2.5 X N	2.5 - 5.0 X N	5.0 - 20.0 X N	>20.0 X N

Ek 6. Dünya Sağlık Örgütü Toksisite Kriterleri-2

Derece	0	1	2	3	4
Pıhtılaşmayla İlgili Toksisite					
PTT	Yaşa göre normal (N)	$> N - \leq 1.5 \times N$	$> 1.5 - \leq 2.0 \times N$	$> 2.0 \times N$	-
Fibrinojen	Yaşa göre normal (N)	$0.75 - 1 \times N$	$0.5 - < 0.75 \times N$	$\geq 0.25 - < 0.5 \times N$	$< 0.25 \times N$
AT III	Yaşa göre normal (N)	$0.75 - 1 \times N$	$0.5 - < 0.75 \times N$	$\geq 0.25 - < 0.5 \times N$	$< 0.25 \times N$
Tromboz	Yok	Katater trombozu	Antikoag. gereks. göstermeyen DVT	Antikoagülasiona gereksinim gösteren DVT	Embolik olay (akciğer emb.), sinüs ven tromb.
Renal Toksisite					
Kreatinin	Yaşa göre normal (N)	$N - 1.5 \times N$	$1.5 - 3.0 \times N$	$3.0 - 6.0 \times N$	$> 6.0 \times N$
Proteinüri (g/l)	Yok	< 3.0	$3.0 - 10.0$	> 10.0	Nefrotik sendrom
Hematüri	Yok	Mikroskopik	Makr., pıhtı yok	Makr., pıhtı var	Transf. gerekli
Kreatinin kler. (ml/dk/1.73 m²)	≥ 90	60 -89	40 - 59	20 - 39	≤ 19
Kardiyak Toksisite					
Aritmi	Yok	Aseptomatik, tedavi yok	Rekürren / persistan, ted. yok	Tedavi gerekli	Hipotans., ventr. aritmi, defibr.
Kalp fonksiyonu	Yaşa göre normal	EF'de %20'den az düşüş	EF'de $\geq$ %20 düşüş	Hafif kalp yetm., ted. ile kompanse	Ağır / refrakter kalp yetmezliği
EKO: LV-SF	$\geq$ %30	$\geq$ %24 - $<$ %30	$\geq$ %20 - $<$ %24	$>$ %15 - $<$ %20	$\leq$ %15
Nörolojik Toksisite					
Santral nörotoksisite	Yok	Geçici letarji	Somnolens $<$ %50 / gün, orta derecede disoryantasyon	Somnolens $\geq$ %50 / gün, ağır disoryantasyon, halüsinasyon	Koma, nöbet
Perif. nörotoks., miyopati	Yok	Parestezi ve/veya DTR'lerde azalma	Ağır parestezi ve/veya hafif kuvvet kaybı	Dayanılmaz parestezi, belirgin motor kayıp	Paralizi
Duygulanımda değişiklik depresyon	Normal	Duygulanımda hafif değişiklik, fonksiyon kaybı yok	Fonksiyon değişikliği ve orta dereceli duyg. deş., ama günlük hayatta kısıtlanma yok	Günlük hayatta kısıtlanma olan ağır duygulanım değişikliği	İntihar eğilimleri ya da kendisi için zararlı
Duygulanımda değişiklik - öfori	Normal	Duygulanımda hafif değişiklik, fonksiyon kaybı yok	Fonksiyon değişikliği ve orta dereceli duyg. deş., ama günlük hayatta kısıtlanma yok	Günlük hayatta kısıtlanma olan ağır duygulanım değişikliği	Kendisi için zararlı
İskelet Sistemine Ait Toksisite (Akut ve Geç Toksisite)					
Osteonekroz	Yok	Asemt., sadece görüntülemeyle tanınıyor	Sempt., fonksiyon kısıtlılığı, ama günlük hayatta kısıtlanma yok	Semptomatik ve günlük hayatta kısıtlanma var	Semptomatik, engellilik

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Burcu

Soyadı : Yazıcıoğlu (Özer)

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara/1983

Eğitimi : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi 2002-2008

Ankara Gazi Anadolu Lisesi 1995-2002

Ankara Ulubatlı Hasan İlkokulu 1990-1995

Yabancı Dili : İngilizce, Fransızca

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar : Milli Pediatri Derneği

Bilimsel Etkinlikleri :

1. Ospedale Gaslini, Genova, İtalya’da Erasmus Staj Programı ile Haziran-Ağustos 2013’te Çocuk Allerji, Pnömoloji bölümünde staj.
2. İleri Acil Ultrason Eğitim Programı Şubat, 2013.
3. Ülger M, Özer B, Derinöz O. Çocuk Acil Serviste İki Asfiksi Olgusu Poster. Ulusal Çocuk Acil Sağlık Kongresi Mart, 2012.
4. Paris, Fransa’da TurkMSIC Staj Programı ile Temmuz 2006’da Genel Cerrahi bölümünde staj.
5. Katowice, Polonya’da TurkMSIC Staj Programı ile Temmuz 2005’te Gastroenteroloji bölümünde staj.