

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİSİ
İLE MULTI-DRUG RESISTANCE 1 (MDR1) GENİ
EKSPRESYONU ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Gözde TÜRKÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. İ. Ömer BARLAS

MERSİN – 2009

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİSİ
İLE MULTI-DRUG RESISTANCE 1 (MDR1) GENİ
EKSPRESYONU ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Gözde TÜRKÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. İ. Ömer BARLAS

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP SBE TTG (GT) 2008-3 YL kodlu proje olarak desteklenmiştir.

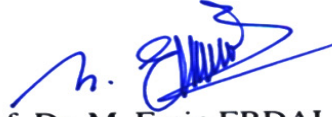
Tez No:.....

MERSİN – 2009

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “ Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi ile Multi Drug Resistance 1 (MDR1) Geni Ekspresyonu Arasındaki İlişki” adlı çalışma, aşağıdaki jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12/06/2009



Prof. Dr. M. Emin ERDAL

Jüri Başkanı

Yrd. Doç. Dr. İ. Ömer BARLAS

Jüri Üyesi



Doç. Dr. Selma ÜNAL

Jüri Üyesi



Yukarıdaki tez, Enstitü Yönetim Kurulunun...19.06.2009...tarih ve 2009/130 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen ve yüksek lisans tezimin hazırlanmasında yapmış olduğu bilimsel katkılarından dolayı danışman hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. İ. Ömer BARLAS'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Anabilim Dalı Başkanımız, Sn. Prof. Dr. M Emin ERDAL' a, Sn. Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ' e, Sn. Doç. Dr. Etem AKBAŞ' a, Sn. Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY'a ve Sn. Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY'a yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tezimde yer alan hasta grubunun toplanması sırasındaki özveri ve yardımlarından dolayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. Selma ÜNAL'a ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı öğretim üyesi Sn. Prof. Dr. A. Bülent ANTMEN'e, tezimin istatistiklerinin yapılması ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Sn. Ar. Gör. Seval KUL'a ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimi proje olarak kabul edip destekleyen, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Biyofizik Anabilim Dalı Sn. Ar. Gör. Selma KORKUTAN'a teşekkür ederim.

Tüm yaşantım boyunca beni yalnız bırakmayan ve her türlü desteği gösteren biricik aileme sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Gözde TÜRKÖZ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi	3
2.1.1. Çocukluk Çağı ALL Patogenezi ve Etiyolojisi	4
2.1.2. Akut Lenfoblastik Löseminin Sınıflandırılması	5
2.1.2.1. Morfolojik Sınıflama	5
2.1.2.2. İmmunolojik Sınıflama	5
2.1.3. Tedavi	6
2.1.3.1. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisinde Kemoterapi Tedavisi	7
2.1.4. Tedaviye Direnç	8
2.1.4.1. İlaç Direnci	8
2.1.4.2. Çoklu İlaç Direnci (MDR)	10
2.1.5. Çoklu İlaç Direnç Mekanizması	10
2.1.5.1. P-glikoprotein Yapısı ve Fonksiyonu	11
2.1.5.2. Normal Dokularda P-gp ekspresyonu	13
2.1.5.3. Tümörlü Dokularda P-gp Ekspresyonu	14
2.1.6. Multi Drug Resistance 1 (MDR1) Geni	15
2.1.6.1. MDR1 Polimorfizmleri	16
2.1.6.2. C3435T Polimorfizmi	16
2.1.6.3. G2677T/A Polimorfizmleri	18
2.1.6.4. T129C Polimorfizmi	18

3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Hasta Gruplarının Toplanması.....	19
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	20
3.2.1. Aletler ve Cihazlar	20
3.2.2. Kimyasal Maddeler.....	20
3.2.3. Çözeltiler.....	21
3.3. Yöntemler	24
3.3.1. RNA İzolasyonu	24
3.3.2. DNA İzolasyonu	25
3.4. Moleküler Analiz	25
3.4.1. MDR1 Geni C3435T Polimorfizminin Belirlenmesi.....	25
3.4.2. MDR1 Geni mRNA Düzeylerinin Belirlenmesi.....	27
3.5. İstatistiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR	31
4.1. ALL Hasta Grubuna Ait MDR1 Geni mRNA Düzey Bulguları	31
4.2. ALL Hasta Grubuna Ait MDR1 Geni C3435T Polimorfizminin Genotip Dağılımı ve Alel Frekans Bulguları.....	33
4.3. MDR1 Geni mRNA Düzeyleri ile C3435T Polimorfizmi Genotip Dağılımları Arasındaki İlişkiye Ait Bulgular.....	35
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	42
7. KAYNAKLAR	44
8. ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İlaç direncinin biyokimyasal mekanizması	9
Şekil 2.2. P-gp'nin iki boyutlu yapısı	12
Şekil 2.3. Kanser ilaçlarının P-gp aracılığıyla hücreden çıkarılması.....	13
Şekil 2.4. MDR1 geninin kromozom 7q21.1'deki lokalizasyonu	15
Şekil 2.5. MDR1 geni 26. eksonda bulunan C3435T polimorfizmi	17
Şekil 4.1. MDR1 geni ve internal kontrol beta aktin geni cDNA'larının elektroforez sonrası fotoğrafı	32
Şekil 4.2. MDR1 geni C3435T polimorfizmine ait alellerin elektroforez sonrası fotoğrafı	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranı ile cinsiyetin karşılaştırılması	32
Çizelge 4.2. Hasta grubuna ait MDR1 geni C3435T polimorfizmi genotip dağılımları	34
Çizelge 4.3. Hasta grubuna MDR1 geni C3435T polimorfizmi ait polimorfizmi alel frekansları.....	34
Çizelge 4.4. Hasta grubunun C veya T aleline sahip olması açısından değerlendirilmesi	35
Çizelge 4.5. Hasta grubunda MDR1 C3435T genotip dağılımları ile MDR1 mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranlarının karşılaştırılması.....	35
Çizelge 4.6. Homozigot TT genotipine sahip olma ile homozigot CC veya heterozigot CT genotipe sahip olan bireylerin MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranlarının karşılaştırılması	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ	: Mikron
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
ABC	: ATP Binding Cassette (ATP Bağlayıcı Kaset mekanizması)
ABCB1	: Adenosine Triphosphate-Binding Cassette Subfamily B Transporter-1 (Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Kaset Subfamilyasının B1 Üyesi)
AGPC	: Asid Guanidinium-Phenol-Chloroform
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
ATP	: Adenosine Triphosphate
Bp	: Base pair
C	: Cytosine
CD	: Cluster of Differentiation
DEPC	: Diethyl Pyrocarbonate
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoxyribonucleotide Triphosphate
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtBr	: Ethidium Bromide
FAB	: French-American-British
GSH	: Glutathione
Kb	: Kilobaz
KLL	: Kronik Lenfoblastik Lösemi
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
LRP	: Lung Resistance-Related Protein
M	: Molar

MDR	: Multi Drug Resistance (Çoklu İlaç Direnci)
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
M-MLV	: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
mRNA	: Messenger Ribonükleik Asit
MRP	: Multi Drug Resistance Associated Protein
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
Na₂ EDTA	: Sodyum-2-Etilendiamin Tetraasetik Asit
NBD	: Nucleotide Binding Domain
N-terminal	: Amino Uç
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
P-gp	: P-glikoprotein
RES	: Retiküloendotelyal Sistem
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAase	: Ribonuclease (RNA yıkıcı enzim)
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
RT-PCR	: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
T	: Timin
TBE	: Tris Borat Etilendiamin Tetraasetik Asit
TMD	: Transmembrane Domain
Tris HCl	: Tris Hidroklorid
U	: Ünite

ÖZET

Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi ile Multi Drug Resistance 1 (MDR1) Geni Ekspresyonu Arasındaki İlişki

Akut lenfoblastik lösemi olgunlaşmamış lenfoid prekürsörlerinin klonal proliferasyonu ile sonuçlanan malign bir hastalıktır ve çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık 1/3'nü oluşturmaktadır.

Akut lenfoblastik lösemnin tedavisinde kemoterapi önemli yer tutmaktadır. Tedavi başladıktan sonra yüksek remisyon oranı gözlenmesine rağmen, hastalığın nüksetmesi söz konusudur. Tedavideki bu başarısızlığın nedeni tedaviye karşı direncin gelişmesidir. Yapısal ve fonksiyonel olarak birbirinden farklı olan ilaçlara karşı gelişen bu dirence “Multi Drug Resistance (MDR)” adı verilmektedir. Bu olayda anti-kanser ilaçların metabolizması için önemli olan proteinleri kodlayan genlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu genler arasında multi-drug resistance 1 geni (MDR1) önemli bir yer tutmaktadır. Bu genin aşırı ekspresyonu, lösemnin tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı bir direncin gelişmesine neden olmaktadır. MDR1 genindeki bazı tekli nükleotid değişimlerinin (SNPs) P-gp ekspresyonunu etkilediği bildirilmiştir. Bu SNP'ler içinde en çok çalışılanlardan biri C3435T polimorfizmidir. Bu polimorfizmin P-gp ekspresyonunda değişikliğe neden olduğu gözlenmiş ve dolayısıyla substrat-ilaç farmakokinetiğiyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızın amacı, ALL tanılı ve kemoterapi tedavisi gören hastaların MDR1 geni mRNA düzeyleri ve C3435T polimorfizmi ile tedaviye yanıt arasında bir ilişki olup olmadığının araştırılmasıdır.

53 ALL tanılı ve kemoterapi tedavisi alan hasta bireyin lenfositlerinden RNA izole edildi ve revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yapıldı. C3435T polimorfizmi, genomik DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyonundan sonra *Mbo I* restriksiyon enzimi ile kesilerek genotiplendirildi.

Çalışmamızın sonucunda MDR1 genotip dağılımları ile MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p=0,026$). CT genotipine sahip bireylerde MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları TT genotipine sahip bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p=0,021$).

MDR1 C3435T polimorfizminin tedaviye yanıtta prognostik bir rolü olabilir.

Anahtar Sözcükler: MDR1, C3435T polimorfizmi, mRNA, RT-PCR, Akut lenfoblastik lösemi

ABSTRACT

Association Between Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Multi Drug Resistance 1 (MDR1) Gene Expression

Acute lymphoblastic leukemia is a malignant disease that results in clonal proliferation of immature lymphoid precursors and it accounts for one-third of childhood cancers.

Chemotherapy has a significant role in ALL therapy. Although high remission rate is seen following the treatment, relapses are also prevalent. The reason of the failure in treatment is the development of a resistance during the chemotherapy. This resistance developing against various structural and functional different drugs is known as Multi Drug Resistance. It's thought that several genes encoding proteins important for anti-cancer drug metabolism responsible for resistance mechanism. Among these genes, Multi Drug Resistance 1 gene (MDR1) has an important place. Overexpression of this gene gives rise to developing a resistance against the drugs used in leukemia treatment. It has reported that certain single nucleotide polymorphisms (SNPs) alter P-glycoprotein (P-gp) expression. C3435T polymorphism is the most studied one among these polymorphism. It was observed that this polymorphism caused altered P-glycoprotein (P-gp) expression, so that C3435T polymorphism was thought to be related to substrat-drug pharmacokinetics.

The aim of our study is to investigate whether there is an association between MDR1 C3435T polymorphism and MDR1 mRNA levels and this relation has an impact on chemotherapy response. From 53 pediatric ALL patients (taking chemotherapy) lymphocyte RNA was isolated, and a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed. C3435T polymorphism was typed by *Mbo I* restriction enzyme following amplification of genomic DNA by the polymerase chain reaction (PCR) method.

Our results indicates a significant differences between genotypic counts and MDR1 mRNA level/ beta actin level rate ($p=0,026$). We found CT genotype carriers have high MDR1 mRNA level/beta actin level rate than TT genotype carriers ($p=0,021$).

MDR1 C3435T polymorphism may have a prognostic role for response to chemotherapy.

Key Words: MDR1, RT-PCR, C3435T polymorphism, mRNA, Acute lymphoblastic leukemia.

1. GİRİŞ

Lösemi, etiyojisi tam olarak bilinmemekle beraber genetik faktörler, çevresel etmenler, ailevi ve sosyoekonomik faktörlerin de gelişiminde etkili olduğu, kan hücrelerinin kemik iliğinde kontrolsüz bölünmesiyle karakterize edilen bir kanser türüdür (1).

Lösemiye ilişkin ilk klinik bilgiler 1845 yılında yayınlamıştır. Başlangıçta “damarların içindeki sarı-beyaz ve yeşilimtrak kitle” olarak tanımlanmış, fakat lökositlerin yapısal özelliklerinden söz edilmemiştir. İlk olarak lösemi, miyelojen lösemi, dalak lösemisi, lenfatik lösemi olarak üç kategoride sınıflandırılmış ve kemik iliğinden kaynaklandığını belirtilmiştir. Daha sonra 1903 yılında lenfoblastik lösemiler akut ve kronik lenfoblastik lösemi olarak ikiye ayrılmıştır. 1905 yılında ise miyeloblast tanımlanmış ve 1914 yılından sonra da lösemnin diğer alt tipleri tanımlanmaya başlanmıştır (2). Biyolojik bakımdan farklı bu dört temel alt grubu; akut lenfoblastik lösemi (ALL), akut miyeloid lösemi (AML), kronik lenfoblastik lösemi (KLL) ve kronik miyeloid lösemi (KML) oluşturmaktadır (3).

Akut lenfoblastik lösemi, lenfoblastların malign proliferasyonu sonrasında kemik iliği, periferik kan ve diğer organları istila etmesi ile oluşan bir lösemi çeşididir. Farklı kökene sahip lenfoid hücrelerden köken alabilmekte ve bu durumda B veya T-hücreli lösemi, bazen de karışık kökene sahip lösemilerin oluşmasına sebep olmaktadır (1,4).

Akut lenfoblastik lösemi çocuklarda yüksek oranda tedavi edilebilen bir hastalık olup, tam remisyon oranı yaklaşık %95’dir (5). Tedavi belli yoğunlukta ve zamanlarda çoklu ilaç uygulamasını (kemoterapi) içermekte olup, indüksiyon, konsolidasyon, idame ve merkezi sinir sistemi (MMS) profilaksisi olmak üzere 4 fazdan oluşmaktadır (1). ALL’nin tedavisinde büyük gelişmeler olmasına rağmen etkilenen çocukların bir kısmında ise hastalık nüksetmektedir. Tedavideki başarısızlık, lösemi hücrelerinin maruz kaldığı ilacın etki seviyesini veya süresini azaltan farmakokinetik direnç olarak da bilinen mekanizmaların bir parçası olduğu düşünülmektedir. Antineoplastik ilaçlara karşı olan direnç genelde malign tümörlerin etkili tedavisinde karşılaşılan önemli sorunlardan biridir (6). Bu olayda anti-kanser ilaçların metabolizması için önemli olan

proteinleri kodlayan genlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu genler (Multi Drug Resistance 1 geni, Multi Drug Resistance-Related Protein geni, Lung Resistance Protein geni) arasında multi drug resistance 1 geni (MDR1) önemli bir yer tutmaktadır (7,8). Bu genin aşırı ekspresyonu, löseminin tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı bir direncin gelişmesine neden olmaktadır (9).

MDR1 geni, 7 numaralı kromozom üzerine yerleşmiş olup, 170-kDa'luk bir protein olan P-glikoproteini (P-gp) kodlar. P-gp, "ATP Binding Cassette (ABC) transporter" adı verilen taşıyıcı proteinler süper ailesinin bir üyesidir ve kanser hücrelerinden ilaçların dışarıya atılmasını sağlayan ATP-bağımlı bir pompanın çalışmasından sorumludur (7,9).

MDR1 geninde çeşitli tekli nükleotid değişimi (SNP) belirlenmiş ve bu durumun P-gp ekspresyonunu etkilediği gözlenmiştir (10). Hattori ve arkadaşlarının (11) yaptığı çalışmada, MDR1 geninin regülatör bölgesindeki polimorfizmlerin ise çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

MDR1 geninde incelenen tekli nükleotid değişimleri (SNP) arasında en fazla ilgiyi, P-gp'nin azalan ekspresyon ve aktivitesinden sorumlu, genin 26. eksonunda bulunan sessiz C3435T polimorfizmi çekmektedir (12).

Çalışmamızda, ALL tanılı ve kemoterapi tedavisi gören hastaların (0-15 yaş arası) MDR1 mRNA düzeyleri ve C3435T polimorfizmi ile tedaviye yanıt arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi

Akut lenfoblastik lösemi olgunlaşmamış lenfoid prekürsörlerinin klonal proliferasyonu ile sonuçlanan malign bir hastalıktır ve çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık 1/3'nü oluşturmaktadır. Akut lösemilerin kesin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Fakat hem kalıtsal yatkınlığın, hem de çevresel faktörlerin ALL sürecinde etkili bir role sahip olduğu düşünülmektedir (13).

Birçok lösemi tipi 1-9 yaş grubunda ortaya çıkarken, pik yaşı 2-5 yaşları arasındadır. Çocukluk çağı lösemilerinin % 10'u 1 yaşının altındaki bebeklerde gözlenmektedir ve hastalığın seyri kötüdür. Daha büyük çocuklarda ise hayatta kalma şansı vardır ve hastalığın seyri lösemi tipine bağlıdır (14). 1960'lı yıllarda kemoterapide gözlenen gelişmeler, sağ kalan lösemili çocukların sayısında dramatik bir artışa sebep olmuştur (14).

Çocukluk çağı kanserlerinin büyük çoğunluğunu oluşturan ALL, Amerika'daki kanserle ilişkili çocuk ölümlerinin temel nedenidir. Her yıl 20 yaşın altında yaklaşık 3250 çocuk lösemi tanısı almaktadır ve bu sayının 2400'ünü ALL oluşturmaktadır (15).

Çocukluk çağı kanser tedavisinde birçok hasta için umut verici gelişmeler olmasına rağmen, hastaların önemli bir kısmında ise tedaviye yanıt alınmamaktadır. Tedaviye yanıt alınmamasının temel nedenlerinden biri, hastada ilaç direncinin gelişmesidir (16).

2.1.1. Çocukluk Çağı ALL Patogenezi ve Etiyolojisi

Akut lenfoblastik lösemi patogenezinde, lösemik blastların kemik iliğinde kontrolsüz çoğalmalarını takiben, periferik kan, dokular ve retiküloendotelial sisteme (RES) yayılmaları söz konusudur (17). Yayılan her bir lösemik klon içerisinde meydana gelen mutasyonlar genetik farklılaşmaya yol açmakta ve bunu dominant mutant subklonların oluşumu izlemektedir (18). ALL blastlarında, hastalık patogenezinin anlaşılmasını sağlayan ve prognozu etkileyen bazı kromozomal anomalilere (yapısal ve sayısal bozukluklar) rastlanmaktadır (19). Bu anomalilerden, kromozomlarda yapısal bozukluğa sebep olan translokasyon en sık gözlenenidir (20).

Çocukluk çağı ALL'sinde gözlenen translokasyonlar: t(9;22) (q34;q11) translokasyonu sonucunda BCR-ABL füzyon gen oluşumu, t(12;21) (p13;q22) translokasyonu sonucu oluşan TEL-AML1 füzyon geni, t(4;11) (q21;q23) translokasyonu sonucu MLL-AF4 füzyon gen oluşumu, t(1;19) (q23;p13) translokasyonu sonucu oluşan E2A-PBX1 füzyon genidir (19).

Lösemi oluşumunu indükleyen iki genel mekanizma olduğu düşünülmektedir. İlk mekanizma, proto-onkogen aktivasyonu veya onkogenik özelliğe sahip füzyon gen oluşumunu içermektedir. Görevli proteinlerin genelde transkripsiyon faktörleri olduğu bu mekanizmada, kan hücrelerinin oluşumu ile farklılaşmasını kontrol eden temel regülatör proteinlerdeki farklılıkların lösemik transformasyonda önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir. İkinci mekanizma ise, tümör supressor genlerin inaktivasyonunu içermektedir. Proto-onkogen aktivasyonu ve tümör supressor genlerin inaktivasyonu hücreye ya bölünme özelliği vermekte ya da onun normal farklılaşmasını ve programlı ölümünü engellemektedir (21).

Çocukluk çağı lösemisinde genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin etkileşiminin de etkili olabileceği düşünülmektedir. Lösemili ikizlerle yapılan çalışmalarda, uterusu meydana gelen genetik durumların önemi üzerinde durulmuş ve bu durumun özellikle de tek yumurta ikizleri için geçerli olduğu düşünülmüştür (1,22). Pombo de Oliveira ve arkadaşlarının (23) yaptığı çalışma, tek yumurta ikizlerinden birinin ALL tanısı almasıyla, diğer ikiz eşinin de önemli oranda lösemi gelişim riskine sahip olduğunu göstermiştir.

Down sendromu, Bloom sendromu, Fankoni anemisi, ve nörofibromatozis gibi bazı genetik sendromların çocukluk çağı lösemilerinin küçük bir kısmından sorumlu

olduğu ve lösemi gelişim riskini artırdığı düşünölmektedir (22,24,25,26,27). Kaye ve arkadaşlarının (28) yaptığı çalışmada, maternal üreme öyküsünün önemli olduğu gözlenmiş ve otuz beş yaşından büyük maternal yaş ile fetal kayıp öyküsünün lösemi gelişim riskiyle ilişkili olduğu bulunmuştur.

2.1.2. Akut Lenfoblastik Löseminin Sınıflandırılması

2.1.2.1. Morfolojik Sınıflama

French-American-British (FAB) çalışma grubunun oluşturduğu sınıflandırmaya göre ALL; L1, L2 ve L3 olmak üzere üç alt tipe ayrılır. Bu sınıflama hücre boyutu, sitoplazma oranı, nükleolus varlığı ve sitoplazmanın bazofili özelliğine göre yapılmaktadır (29).

a) L1 tip: Hücreler küçük, homojen ve dar sitoplazmalıdır. Çocuklarda en yaygın görölen alt gruptur ve çocukluk çağı ALL'lerinin % 84'ini oluşturur (30,31).

b) L2 tip: Hücreler daha büyük ve heterojen, nükleusları düzensiz ve en az bir tane büyük nükleolus içermektedir. Erişkinlerde en sık rastlanan ALL tipi olup, çocukluk çağı ALL'sinin yaklaşık % 15'ini oluşturmaktadır (30,31).

c) L3 tip: Hücreler büyük ve homojen, sitoplazma bazofilik ve vakuollüdür. Çok yaygın gözlenmemekle birlikte çocukluk çağı ALL'sinin % 1'ini oluşturmaktadır (30,31).

2.1.2.2. İmmunolojik Sınıflama

Bu sınıflandırma klinik olarak daha uygun olup, temeli lösemi hücre yüzeyindeki belli antijenlerin ekspresyonuna dayanmaktadır. Sağlıklı lenfositler farklılaşmanın değişik aşamalarında düzenli olarak spesifik antijenler eksprese etmektedirler (1).

Yüzey antijenleri, başkalaşım kümeleri (Cluster of Differentiation, CD) olarak adlandırılmakta ve hücrenin hangi gelişim aşamasında olduğu konusunda bilgi vermektedir. Bu sınıflandırmaya göre ALL 4 tipe ayrılmaktadır:

a) Erken Pre-B Hücreli ALL: Çocuk ve yetişkinlerdeki ALL vakalarının yaklaşık %70'i bu kategoride yer almaktadır. Hastalar çoğunlukla gençtir (1-9 yaş) ve

düşük lökosit sayılarına sahiptirler. 1 yaşından küçük çocukların yarısı, daha büyük yaştaki çocukların %10'u ve yetişkinlerin % 10-40'ı CD10 eksprese etmemektedirler. CD10 ekspresyonunun eksikliği, yüksek lökosit sayısı ve kötü prognozla ilişkilidir (1).

b) Pre-B Hücreli ALL: Bu grup, sitoplazmik immunoglobulin ağır zincirlerinin ekspresyonu ile tanımlanmaktadır. Tüm ALL vakalarının yaklaşık olarak %20'sini oluşturmaktadır ve erken Pre-B Hücreli ALL'ninkine benzer sıklıkta CD10 eksprese etmektedir. Hastalar yüksek hemoglobin seviyesi, lökosit sayısı ve laktik dehidrogenaz seviyesine sahiptirler (1).

c) T-Hücreli ALL: Çocukluk çağı ALL vakalarının yaklaşık %13-15'ni oluşturmaktadır. İleri yaş, yüksek lökosit sayısı, merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu ve mediastinal kitlelerle ilişkilidir (1).

d) Olgun B-Hücreli ALL: ALL hastalarının % 5'inden daha azında gözlenmekte ve Burkitt lenfomaya özgü bir lösemik faz göstermektedirler. Hastalarda abdominal lenfadenopati ve sıklıkla MSS tutulumu da görülmektedir. Morfolojik olarak FAB sınıflandırmasının L3 tipini göstermektedir (3).

2.1.3. Tedavi

Akut lenfoblastik lösemi tedavisinde, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, kemik iliği nakli başlıca tedavi şekilleridir. Tedavinin temelini kemoterapi oluşturmaktadır. Özel durumlarda beyni korumak ve tedavi için radyoterapi (ışın tedavisi) uygulanmaktadır, fakat ana tedavideki yeri kısıtlıdır (32).

2.1.3.1. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisinde Kemoterapi Tedavisi

Çocukluk çağı ALL tedavisinde kemoterapi tedavisi önemli yer tutmaktadır. Tedavi süreci indüksiyon, konsolidasyon, idame tedavisi ve MMS proflaksisini içermektedir. İndüksiyon tedavisinde amaç ilk lösemi hücrelerinin % 99'undan fazlasını yok etmek ve normal kan yapımını yeniden sağlamaktır. Bu yaklaşım bir glukokortikoid (prednisone ve dexamethasone), vinkristine ve en azından üçüncü bir ilacın (asparaginaz, antrasiklin veya her ikisi birden) uygulanmasını içermektedir. Üçlü ilaç indüksiyon tedavisi standart riske sahip kişiler için yeterli görülmektedir (33).

Normal kan yapımı ve vücut fonksiyonunun tekrar sağlanmasının ardından ilaca dirençli rezidüel lösemik hücreleri ortadan kaldırmak için konsolidasyon tedavisi kullanılmakta ve böylece relaps riski azalmaktadır (33). Konsolidasyonun yoğun olarak kullanılması ALL'li çocukların tedavisinde oldukça önemlidir. Yüksek dozda metotreksat (bazen 6-merkaptopürin, teniposide veya sitarabin ile kombinasyonu) uygulanması ile ALL'li çocuklarda yaklaşık % 70-80 tedavi oranı sağlanmıştır (33).

Çocukluk çağı ALL'sine ilişkin çalışmalar idame tedavisinin önemini vurgulamaktadır. İdame tedavisinde 2 yıl boyunca 6-merkaptopürin ve metotreksat kullanılmaktadır ve tedavinin amacı relapsı engellemektir (33).

Santral sinir sistemi hastalığına çocukların ve yetişkinlerin % 5'inde teşhis sırasında rastlanmaktadır. MSS proflaksisi, MSS relaps insidansını düşürmektedir. Kraniuma ilişkin radyasyon ve metotreksat ya da sitarabin ile yapılan intratekal kemoterapi gibi MSS proflaksisinde içerilen farklı tedavi yöntemleri çocukluk çağı ALL tedavisinde standart olarak kullanılmaktadır (1).

2.1.4.Tedaviye Direnç

2.1.4.1. İlaç Direnci

İlaç direnci çeşitli biyokimyasal mekanizmaların bir sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir (34). Şekil 2.1.' de gösterilen biyokimyasal mekanizmalar:

- a)** İlaç alınımında ve etkinliğinde azalma
- b)** İlacın hücre dışına atılımındaki artış,
- c)** İlacın azalan metabolik aktivasyonu,
- d)** İlaç deaktivasyonunda artış,
- e)** Hedef bölge ile etkileşimini önleyen ilaç sekestrasyonu,
- f)** Hedef bölge konsantrasyonlarının intrasellüler artışı,
- g)** Hedef bölgedeki yapısal değişiklikler,
- h)** Hedef bölge fonksiyonunda duplikasyon,
- i)** Hasarlı hedef bölgenin onarımıdır.

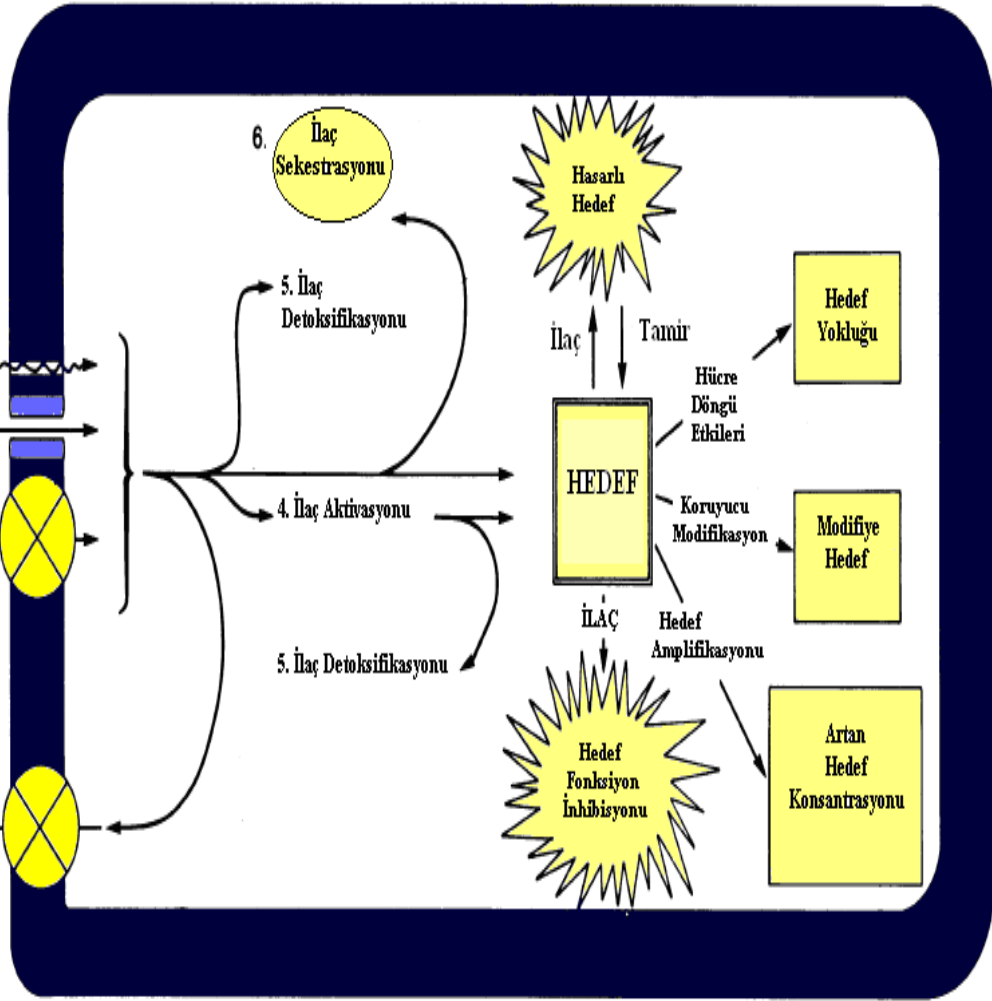
Klasik olarak direnç, ekstrinsik ve intrinsik olarak ikiye ayrılmaktadır. Ekstrinsik direnç ilaçların tümör hücresine ulaşamamasından, intrinsik direnç ise tümör hücrelerinin özelliğinden kaynaklanmaktadır. İntrinsik direnç in vitro olarak gözlenmekte olup 2 gruba ayrılır: Hücreler eğer tek bir ilaca karşı direnç gösterirse basit direnç, farklı biyokimyasal hedeflere sahip kemostatik ilaçlara karşı çapraz direnç gösterirlerse çoklu ilaç direnci (Multi Drug Resistance, MDR) olarak adlandırılmaktadır (35).

1. İlaç Dağılımı



2. Hücreye Giriş

3. Hücreden Çıkış



Şekil 2.1. İlaç direncinin biyokimyasal mekanizması (34)

2.1.4.2. Çoklu İlaç Direnci (MDR)

Çoklu ilaç direnci, belirli bir ajana karşı dirençli olarak seçilen birçok tümör hücrelerinin çeşitli ilaçlar, anthrasiklinler, vinka alkaloidler, epipodofillotoksinler, taksol, kolşisin gibi yapısal ve fonksiyonel bileşiklere karşı çapraz direnç göstermesi olarak bilinmektedir (36). MDR, hastalarda sık olarak gözlenmekte ve bazı mekanizmalarla oluşmaktadır. Farmakolojik mekanizmaların temelinde tümörlü hücrelerden ilaçların aktif olarak atılımı yatmaktadır (35).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve kolon kanseri gibi kanserleri içeren malignansiler rezistans bir fenotip ve sitotoksik ilaçlara karşı yetersiz bir cevaba sahiptirler. İlerlemiş meme ve yumurtalık kanserleri gibi diğer tümörlerde de başlangıç bir yanıtta sonra relaps gelişmekte ve birçok ilaca dirençli hale gelmektedir (36).

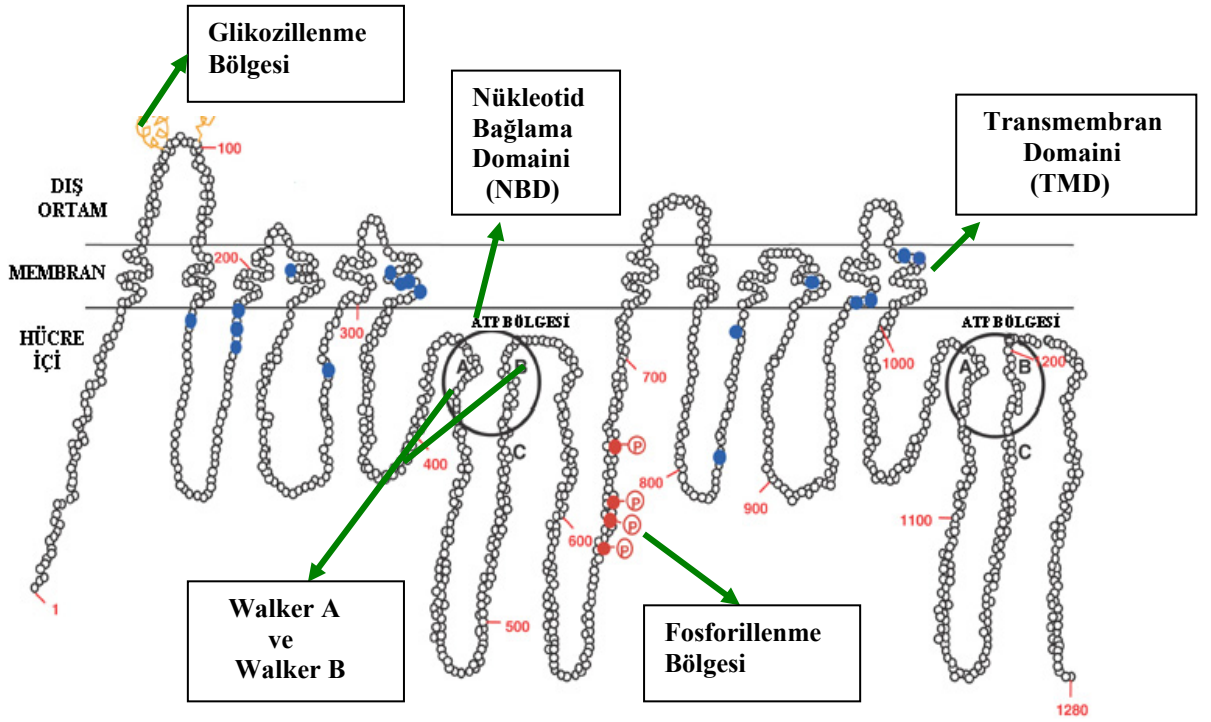
2.1.5. Çoklu İlaç Direnç Mekanizması

İlaç direncini açıklayan birçok hücrel mekanizma karakterize edilmiştir. Bu mekanizmalar, insan multi-drug rezistans ilişkili protein (MRP) tarafından ilaçların artan atılımı, DNA topoizomera II gibi ilaç hedeflerindeki değişimleri ve bileşiklerin artan detoksifikasyonunu içermektedir. MDR'nin klasik formu ise, bir transmembran ilaç atılım pompası olarak fonksiyon gören P-glikoproteini (P-gp) kodlayan MDR1 geninin aşırı ekspresyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (36).

2.1.5.1. P-glikoprotein Yapısı ve Fonksiyonu

P-glikoprotein, ATP-Binding Cassette (ABC) superfamilyası olarak da bilinen taşıyıcı proteinlerin geniş bir grubuna aittir ve bu familyaya benzer yapısal ve fonksiyonel özellikler göstermektedir (37). ABC taşıyıcı protein üyeleri yüksek oranda korunmuş iki ATP bağlayıcı bölge içermektedir. Bu superfamilya üyeleri iyonlar, şekerler, amino asitler, peptidler, proteinler, ilaçlar ve toksinler gibi bir çok maddenin taşınımından sorumludurlar (38). ABC superfamilyası içinde yer alan P-gp, fosforillenmiş ve glikozillenmiş bir protein olup 170 kDa'luk bir moleküler ağırlığa sahiptir (36).

1280 amino asit içeren P-gp, birbirine yüksek oranda benzeyen iki kısımdan oluşmaktadır. Her bir kısım, bir nükleotid bağlama domaini (NBD) ve yüksek oranda hidrofobik olan altı transmembran domaini (TMD) içermektedir (Şekil 2.2.). TMD'lerin ilaç moleküllerinin membrandan geçişinde rol oynadığı düşünülmektedir. Proteinin amino ve karboksil terminal uçları ile NBD'ler intrasellular alanda lokalize olmuştur. Molekülün N-terminal kısmının ekstrasellular bölgesinde tek bir glikozillenme bölgesi vardır (36). Her bir NBD Walker A ve B olmak üzere iki motifden meydana gelmiştir. Bu motiflerin ATPazlarda bulunduğu, nükleotidlerin bağlanması ve hidrolizinde görev aldıkları düşünülmektedir. Her iki NBD P-gp'nin normal işleyişi için gereklidir ve P-gp aktivitesi tamamen ATP varlığına bağlıdır. ATP bağlayıcı domainler ATPaz olarak işlev görmekte olup P-gp'nin substratları membran dışına çıkarmada gerekli enerjiyi sağlamaktadır. P-gp'nin işlev görebilmesi için ATP her iki NBD'ye de bağlanmakta, fakat P-gp aktivitesi için her iki ATP'nin de hidrolize olup olmadığı henüz bilinmemektedir. ATP'nin bağlanması ile P-gp'de konformasyonel değişiklikler olmakta ve hidrolizi ile de transport gerçekleşmektedir (39).



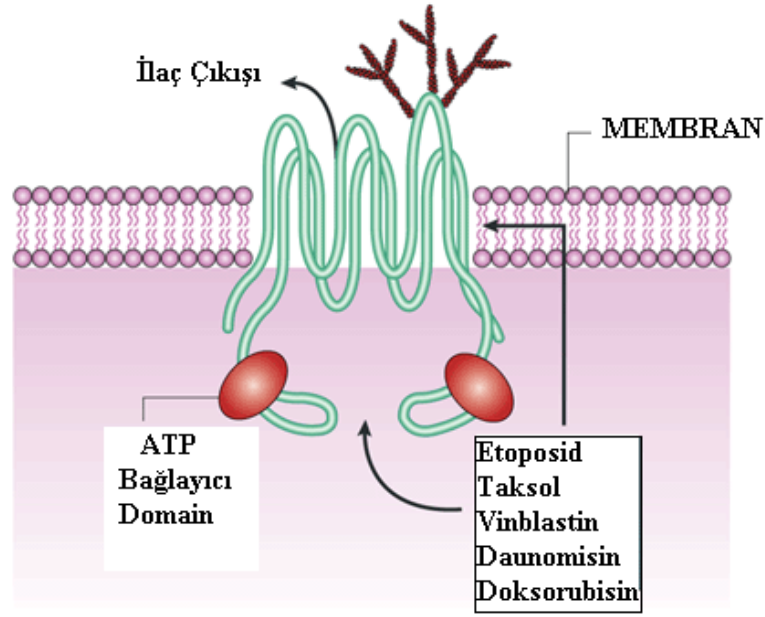
Şekil 2.2. P-gp'nin iki boyutlu yapısı (40)

ATP bağımlı akış pompası olarak görev yapan P-gp belli ekzogenik ve endogenik maddeleri hücre dışına çıkaran bir membran proteinidir. P-gp'nin dokulardaki fizyolojik ekspresyonu çeşitli hücrelerdeki ilaç detoksifikasyonu için gerekli olan belirleyicilerinden biridir ve bu durum potansiyel olarak zararlı bileşiklere karşı hücrel savunma mekanizması sağlamaktadır (11).

P-gp'nin içerdiği transmembran segmentlerinin ilacın dışarı atıldığı bir kanal oluşturduğu ve ATP bağlanma bölgesinin ise konsantrasyon gradiyentine karşı ilacın hücre dışına çıkarılmasında gereken ATP hidrolizinde görev aldığı düşünülmektedir (41).

ATP bağlanma bölgelerinin birinde meydana gelen önemli amino asit değişikliklerinin pompa fonksiyonunu bozduğu gözlenmiştir (42). P-glikoprotein, ilacın bağlandığı taşıyıcı proteini hücre dışına pompaladığının düşünülmesine rağmen, direkt olarak ilaca bağlandığı yönünde de kanıtlar bulunmaktadır (43).

P-gp, ilaçları modifiye olmamış formuyla taşımaktadır. İlaçların hücre dışına akışını artırarak, hücre içi konsantrasyonunu düşürmekte ve sonuçta birçok sitotoksik antikanser ilaca karşı bir direnç oluşturmaktadır (44) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Kanser ilaçlarının P-gp aracılığıyla hücreden çıkarılması (45)

2.1.5.2. Normal Dokularda P-gp Ekspresyonu

P-glikoprotein normal dokulardaki ekspresyonu hücreleri toksik maddelerden korumaktadır. P-gp insanda böbreküstü bezlerinde yüksek oranda eksprese olurken, akciğer (solunum epiteli), mide, kolon, pankreas, plasenta ve prostatda orta seviyede, beyin, kemik iliği, özofagus, kalp, düz kas, timus ve deride ise düşük seviyede eksprese olmaktadır (44).

2.1.5.3. Tümörlü Dokularda P-gp Ekspresyonu

Lösemi, malign lenfoma, yumurtalık ve böbrek kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri, kemik ve yumuşak doku tümörleri, nöroblastoma, gastrik ve kolorektal kanser gibi çok sayıda insan tümöründe P-gp ekspresyonunda artış saptanmıştır (46). Karaciğer, kolon, böbrek ve pankreas gibi P-gp eksprese eden dokulardan kaynaklanan kanserlerde MDR1 geni yüksek oranda eksprese olmaktadır. Bu tümörler genelde kemoterapiye direnç göstermektedirler. Diğer tümörler orta veya düşük MDR1 mRNA ekspresyon seviyesine sahiptirler. MDR1 mRNA'sı bazı tümörlerde, özellikle de P-gp'nin normalde düşük eksprese edildiği organ tümörlerinde saptanmamıştır (47). Weinstein ve arkadaşları (48) yaptıkları bir çalışmada, P-gp ekspresyonu ile damar envazyonu ve lenf düğümü metastazı arasında ilişki bulmuştur.

.Birçok çalışma lösemi ve diğer kanser tiplerinin tedavisinde kemoterapötik ilaç kullanımının P-gp'nin aşırı ekspresyonuyla sonuçlandığını göstermiştir. P-gp'nin aşırı eksprese olmasından dolayı ya lösemi başlangıcında ya da relaps anında kanser hücreleri direnç kazanmakta ve tedaviye yanıt verememektedirler (44). P-gp ekspresyonu ksenobiyotikler ve hormonlar gibi çeşitli faktörlerle regüle edilmektedir. Isı şok proteinleri, onkogen transfeksiyonu, hücre farklılaşması veya çoğalması P-gp ekspresyonunu modüle edebilmektedir (36). Doksorubisin veya vinkistrin gibi hidrofobik ilaçların inhibe edici konsantrasyonlarında tümör hücrelerinin büyümesi, glikoprotein üretimini sağlayan stabil varyantların seçilmesine neden olabilmektedir (49).

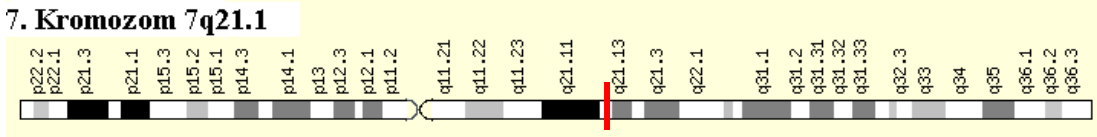
Doksorubisin, vinkristin ve etoposid gibi P-gp substratları çocukluk çağı ALL tedavisinde kullanılmaktadır. Merkezi sinir sisteminde P-gp ekspresyon seviyesinin düşük olması, çocukluk çağı ALL tedavisi için kullanılan bu substratların merkezi sinir sisteminden geçişini artırmasıyla sonuçlanmaktadır (50).

2.1.6. Multi Drug Resistance 1 (MDR1) Geni

Adenosine Triphosphate-Binding Cassette B1 (ABCB1) geni olarak da adlandırılan MDR1 geni değişik yapı ve fonksiyondaki ilaca karşı hücrelerin verdiği direnci tanımlamaktadır (51).

MDR1 geni 7. kromozomun uzun kolunda (7q21.1) lokalize olmuştur (Şekil 2.4.). 100 kb'dan daha fazla baz içeren, 28 intron ve 28 eksondan oluşmakta, promotor bölgesinde TATA kutusu bulunmamaktadır. MDR1 mRNA'sı 4.7 kb'dır ve genin toplam boyutunun % 5'i mRNA olarak kodlanmaktadır (37,52).

MDR1 geni, ilaçların hücre içine girişini ve hücre dışı alanda depolanmasını sınırlandıran bir protein olan P-glikoproteini (P-gp) kodlamaktadır (51).



Şekil 2.4. MDR1 geninin kromozom 7q21.1'deki lokalizasyonu (53)

Lösemi başlangıcında veya relaps döneminde dirençli hücrelerin bulunması tedavide önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan in vitro çalışmalarda, kemoterapötik ilaçlara karşı direnç gelişiminde MDR1 geninin etkili olduğu gözlenmiştir (54). Lösemi tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişimi MDR1 geninin aşırı ekspresyonu ile ortaya çıkmaktadır. Lösemi başlangıcında MDR1 geninde gözlenen ekspresyon artışının klinik önemine ilişkin yapılan bir çalışmada, yüksek ekspresyon seviyesinin AML'de kötü prognostik bir faktör olabileceğini önermektedir (55).

2.1.6.1. MDR1 Gen Polimorfizmleri

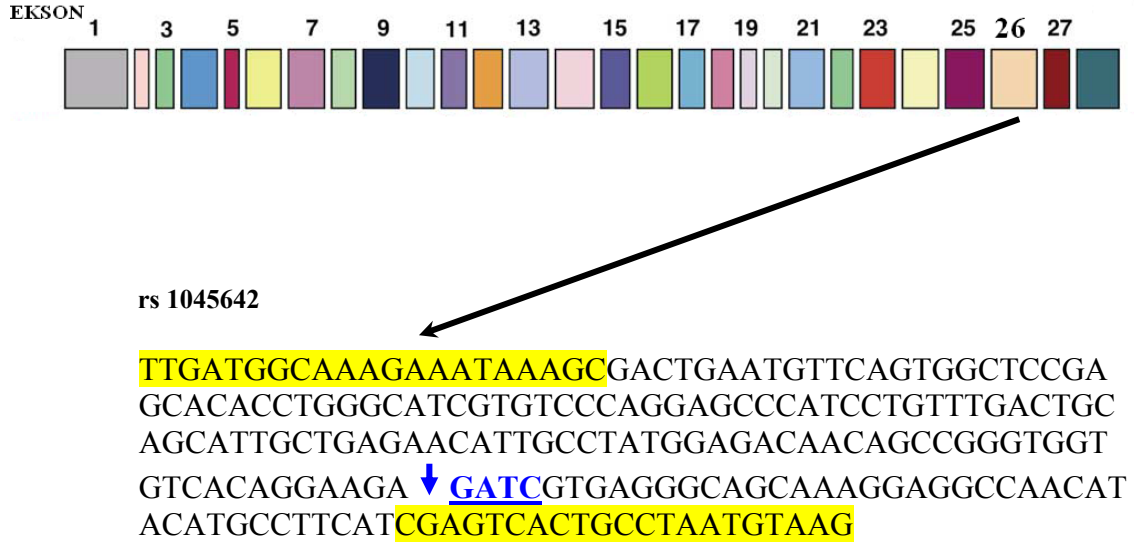
MDR1 genine ilişkin çok sayıda tekli nükleotid polimorfizmleri (SNPs) bulunmaktadır. Bu polimorfizmlerin bazıları amino asit değişikliğine neden olmazken (C1236T, C3396T ve C3435T), bazıları ise kodlanan amino-asitte değişime sebep olmaktadır (A61G, G1199A, A2956G, T3421A) (56).

Hoffmeyer ve arkadaşları (10), MDR1 gen polimorfizmlerini belirlemek için sağlıklı Kafkas populasyonu üzerinde yaptığı araştırmada, intron ve ekson bölgelerinde 15 farklı SNP göstermişlerdir.

MDR1 geni ait tekli nükleotid polimorfizmlerinden bazılarının P-gp ekspresyonunu etkilediği düşünölmektedir. Yapılan çalışmalar normal dokularda C3435T (ekson 26), G2677T (ekson 21) ve T129C (ekson 1b) polimorfizmlerinin düşük P-gp ekspresyonuyla ilişkili olduğunu göstermiştir (57,58).

2.1.6.2. C3435T Polimorfizmi

Ekson 26'da wobble pozisyonundaki C3435T polimorfizmi (rs1045642) kodlanan amino asitlerde herhangi bir değişikliğe neden olmayan sessiz bir polimorfizmdir (Şekil 2.5.). Marzouk ve arkadaşlarının (59) yaptığı çalışmada, bu polimorfizmin P-gp ekspresyonunda değişikliğe neden olduğu gözlenmiş ve dolayısıyla substrat-ilaç farmakokinetiğiyle ilişkili olabileceği düşünölmüştür.



Şekil 2.5. MDR1 geni 26. eksonda bulunan C3435T polimorfizmi. Mavi renk ile belirtilen kesim bölgesi *MboI* polimorfizmi için belirlenen tanıma ve kesim bölgesidir (40)

C3435T polimorfizmi ile ilaç kullanımı/dağılımı arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Bir hipoteze göre, C3435T polimorfizminin alternatif splicing oluşturduğu ve bunun sonucunda yabancı tip P-gp ile kıyaslandığında daha kısa bir proteinin meydana geldiği belirtilmiştir (40). Bazı populasyonlarda çoğunlukla 3435 pozisyonundaki polimorfik alelin, P-gp ekspresyonunu etkileyen başka polimorfizmlerle (G2677T/A, T129C) bağlantılı olduğu gözlenmiştir (40). C3435T polimorfizminin (rs 1045642), mRNA işlenmesi ile ilgili diziler, promotor veya enhancer bölgeler gibi ekspresyonu kontrol eden MDR1 gen bölgelerinde gözlenen değişimlerle ilişkili olduğu, posttranskripsiyonel modifikasyonları etkilediği ve mRNA'nın translasyonel kontrolünü değiştirdiği düşünülmektedir (10,56).

C3435T polimorfizmine ilişkin Hoffmeyer ve arkadaşlarının (10) yaptığı çalışmada, TT genotipine sahip bireylerde intestinal P-gp ekspresyonunun azaldığı ve dolayısıyla digoksin ilaç alınımının arttığı, CC genotipindeki bireylerde ise P-gp ekspresyonunun arttığı ve dolayısıyla digoksin ilaç alınımının da azaldığı gözlenmiştir.

2.1.6.3. G2677T/A Polimorfizmleri

G2677T ve G2677A polimorfizmleri 21. eksonda lokalize olmuştur. 2677. pozisyondaki G→T ve G→A dönüşümleri anlamsız mutasyonlardır ve P-gp intrasellüler kısmında yer almaktadırlar. 2677. pozisyonda Ala893, threonin veya serin amino asitiyle yer değiştirmekte ve bu durum lipofilik rezidünün hidrofilik rezidüye dönüşümüyle sonuçlanmaktadır. Alanin yapısal olarak nötral bir amino asit olduğu için serinle yer değiştirmesi, P-gp etkileşim bölgesinin geometrik kesinliğini ve ikincil yapısını etkileyebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, G2677T polimorfizmi için TT homozigot genotipe sahip bireylerin daha düşük P-gp ekspresyonuna sahip olduğu gözlenmiştir (58).

2.1.6.4. T129C Polimorfizmi

T129C polimorfizmi ekson 1b'de lokalize olup, transkripsiyon başlama bölgesinin 7kb downstreamindedir. Bu polimorfizmin, promotor bölgedeki kritik lokalizasyonundan dolayı P-gp ekspresyonu üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (58). Tanabe ve arkadaşları (58) yaptıkları çalışmada, T129C aleli için heterozigot bireylerin (CT) homozigot (TT) bireylerden daha düşük plasental P-gp ekspresyonuna sahip olduğu gözlemiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Gruplarının Toplanması

Araştırmamıza, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı'na başvuran, ALL tanısı konmuş ve kemoterapi tedavisi gören 53 hasta birey (0-15 yaş arası) dahil edildi.

Çalışmamızda hasta grubu oluşturulmadan önce Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

Kemoterapi tedavisi gören hasta bireylerden 1 ml % 2'lik etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine yaklaşık 6 ml periferik kan örnekleri alındı ve periferik dolaşımdaki lökositlerden DNA izolasyonu, DNA izolasyon kiti yöntemiyle yapıldı. Elde edilen DNA'lar analiz edilinceye kadar + 4 °C'de saklandı.

Alınan kan örneklerinden Asid Guanidinyum-Fenol-Kloroform (AGPC) yöntemiyle RNA izolasyonu yapıldı (59). Elde edilen RNA'lar kısa sürede "Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR)" yöntemi ile cDNA'ya çevrildi ve analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklandı.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Aletler ve Cihazlar

- Termal Cycler (Techne Flexigene, Cambridge, UK)
- Elektroforez tankı (EC Midicell EC 350, 10x20cm)
- Elektroforez Güç Kaynağı (EC 135-90)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Manyetik karıştırıcı (Nüve MK 418)
- Mikrodalga Fırın (Alaska)
- Hassas terazi (AND GR-200)
- Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- Vorteks (VELP)
- Santrifüj (Nüve NF 800)
- Mikropipet Seti (Eppendorf)
- Derin Dondurucu (Arçelik-2031 D)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)

3.2.2. Kimyasal Maddeler

- β -merkaptotanol (Sigma M3148)
- 100 bp DNA ladder GeneRuler marker (Fermentas SM 0241)
- 10X PCR Buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fermentas B33)
- 2 mM dNTP Mix (Fermentas, R0241)
- 25 mM MgCl_2 (Fermentas)
- Agaroz Plus (Prona agarose plus, E.U)
- Borik Asit (Carlo Erba 302177)
- Bidistile Su
- Dietilpirokarbonat (DEPC) (Serva 18835)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Ethidium Bromide (Sigma E-1510)
- Na_2EDTA (Sigma E-5134)

- Fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) (Amresco K169)
- Guanidyum tiyosiyanat (Amresco 0380)
- Kloroform/izoamil alkol (24:1) (Amresco 0757)
- Orange G (Sigma O-3756)
- *Mbo I* (Fermentas 0812)
- Primerler
- Proteinaz-K (Sigma P-2308)
- Revers transkriptaz (M-MLV) (Fermentas EP0441)
- RNAse inhibitör (Fermentas E00381)
- Sodyum laurilsarkozin (Amresco 0719)
- Sodyum sitrat (Sigma S-4641)
- Taq DNA Polimeraz (Fermentas, EP0402)
- Tris-Hidroklorid (Sigma T-7149)
- Trizma Base (Sigma T-6066)
- DNA izolasyon kiti (Roche 11 796 828 001)
- Gliserol (Merck 4091)
- İzopropanol (Sigma I9516)

3.2.3. Çözeltiler

1. 10 mg/ml Proteinaz K Çözeltisi

100 mg Proteinaz K, 10 ml steril distile su ile çözümlenerek hazırlandı ve -20°C 'de saklandı.

2. 10XTBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu

Trizma Base.....108 g

Borik asit54,8 g

EDTA.....5,44 g

Distile su ile 1lt'ye tamamlanarak çözüldü.

3. Orange G çözeltilisi

Na₂EDTA.....2,232 g

Orange G.....200 mg

60 ml Gliserol ve 40 ml distile sudan oluşan solüsyon içerisinde çözüldü.

4. Elektroforez Yürütme Tamponu

10X TBE tamponundan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE içerisinde 0,5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde etidyum bromid (EtBr) konularak hazırlandı.

5. % 3'lük Agaroz Jel Solüsyonu

140 ml 1X TBE tamponu içerisinde 4,2 g agaroz (Agarose plus) mikrodalga fırında eritildikten sonra 0,5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde EtBr eklenerek hazırlandı.

6. Dietilpirokarbonat (DEPC) H₂O

1000 ml deiyonize su içine 2 damla DEPC konup iyice çalkalandı.

Bir gece oda ısısında bırakıldı.

60 °C'de 2 saat kapağı hafifçe gevşetilerek tutulur ve ardından otoklavlandı.

+ 4 °C'de saklanır. Bu ısıda 1 yıl stabildir.

7. 0.75 M Sodyum Sitrata

Sodyum sitrat 5.5 H₂O 15.78 g

DEPC H₂O ile 100 ml' ye tamamlandı (pH 7.0)

Otoklavlayarak sterilize edildi.

Oda ısısında 6 ay stabildir.

8. %10 Sarkozil

Sarkozil 1 g

DEPC H₂O 10 ml

Oda ısısında en az 3 ay stabildir.

9. 4M Guanidinyum Tiyosiyanat (GSCN)

Guanidinyum tiyosiyanat 25 g (4M)

0,75 M sodyum sitrat 5 ml (75 mM)

% 10 Sarkozil 2,5 ml

DEPC HO₂ 50 ml'ye tamamlanır.

Bu karışım oda ısısında 3 ay stabildir.

10. Denatürasyon Çözeltisi (Solusyon D)

GSCN 4M çözeltisi 9,9 ml

2-merkaptoetanol (14 M) 0.1 ml

Bu karışım oda ısısında 1 ay stabildir.

3.3. Yöntemler

3.3.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu, Asid Guanidinyum- Fenol-Kloroform (AGPC) yöntemi ile yapıldı (59):

1. İçinde EDTA'lı 6 ml kan bulunan 15 ml'lik santrifüj tüpü üzerine soğuk steril distile su ilave edilerek yaklaşık 13 ml'ye tamamlandı.
2. Karışım 2-3 dk hızlı olarak aşağı yukarı karıştırıldı.
3. 10 dk 2000 rpm'de oda ısısında santrifüj edildi.
4. Supernatant atıldıktan sonra peletin üzerine soğuk steril distile su ilave edilerek yaklaşık 13 ml'ye tamamlandı.
5. 10 dk 2000 rpm'de santrifüj edilir ve süpernatant atıldı.
6. Bu işlem yaklaşık 4-5 kez tekrarlandı.
7. Oluşan peletin 200 µl'si RNA izolasyonu için 1,5 ml'lik ependorf tüpe ayrılarak 500 µl serum fizyolojik (% 0,9 NaCl) ile sulandırıldı.
8. 1.5 ml'lik steril ependorf tüplere, 500 µl denatürasyon solüsyonu bırakıldı. Üzerine serum fizyolojik ile sulandırılmış lenfosit peletinden 200 µl ilave edip birkaç saniye vortekslenerek buz içinde 15 dk bekletildi.
9. Karışımların üzerine 700 µl fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ekleyip buz içinde 15 dk daha bekletildi.
10. Tüpler 4 dk 10 000 rpm'de santrifüj edildi.
11. Üst faz alınıp yeni bir 1.5 ml lik steril ependorf tüplere aktarıldı.
12. Yeni tüplere 700 µl kloroform-izoamil alkol (24:1) ekleyip 2 dk 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
13. Üst sıvı fazı yeni bir 1.5 ml lik steril ependorf tüpe aktarılıp, alınan bu üst faza 1 ml absöü etanol eklendi ve - 20 °C'de bir gece bırakıldı.
14. Tüpler - 20 °C'den alınıp 15 dk 12.500 rpm'de santrifüj edildi.
15. Tüplerdeki etanol dökülüp 500 µl % 70'lik etanol eklendi ve birkaç saniye vortekslendikten sonra 5 dk 12.500 rpm'de santrifüj edildi.
16. Süpernatantı dökülüp tüplerin dibinde kalan etanol pipetle uzaklaştırıldı.
17. Tüplerin ağzı açık olarak en az 10 dk bekletilip pelet üzerine, 50 µl DEPC-distile su eklendi.
18. RNA'nın çözülmesi için 70 °C'de 1 saat bekletildi.

3.3.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, “High Pure PCR Template Preparation Kiti (Roche)” ile yapıldı. 200 µl periferik kan bulunan mikrosantrifüj tüpüne, 200 µl Binding Buffer ve 40 µl proteinase K ilave edilerek birkaç saniye vortekslendi. 70 °C’de 10 dakika tutulduktan sonra üzerine 100 µl izopropanol eklendi ve dikkatli bir şekilde vortekslendi. Mikrosantrifüj tüpündeki karışım toplama tüpü içerisindeki filtre tüpüne alındı. 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildikten sonra, alttaki toplama tüpü atılarak filtre tüpü steril bir toplama tüpüne yerleştirildi ve üzerine 500 µl Inhibitor Removal Buffer ilave edilerek 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü atılarak filtre tüpü yeni bir toplama tüpüne alındı ve üzerine 500 µl Washing Buffer eklenerek 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi (bu işlem iki kez tekrarlandı). Filtre tüpü steril mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine yaklaşık 1 saat 70 °C’de tutulan Elution Buffer’dan 200 µl ilave edildi ve 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edilerek DNA elde edildi.

3.4. Moleküler Analiz

3.4.1. MDR1 Geni C3435T Polimorfizminin Belirlenmesi

Çalışmamızda, MDR1 geni C3435T polimorfizmini belirlemek amacıyla ilk olarak MDR1 gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyonda bu bölgeye özgü F- 5'- TTG ATG GCA AAG AAA TAA AGC -3' ve R - 5'- CTT ACA TTA GGC AGT GAC TCG -3' primerleri kullanıldı (60).

Ekson 26’daki C→T tek nükleotid değişimini belirlemek için, PCR sonrası elde edilen 208 bp’lik PCR ürünleri bu bölgeyi tanıyan bir *MboI* enzimi ile restriction fragment length polymorphism (RFLP) işlemi uygulandı. RFLP işlemi 20 örnek için; 190 µl bidistile su, 50 µl buffer R ve 40 ünite (10u/µl) *Mbo I*’dan oluşan enzim karışımı hazırlandı. PCR ürünü bulunan her bir tüpe, 12 µl hazırlanan RE enzim karışımından eklendi ve 1 gece 37 °C etüvde bekletilerek kesme işlemi gerçekleştirildi. Kesme işlemi sonucunda T aleline sahip gen bölgeleri kesilmezken, C aleline sahip gen bölgeleri kesildi. Kesme işlemi gerçekleştirildikten sonra, tüplerin her birine 10 µl orange G eklendi. Sonra, % 3’lük agaroz jel hazırlandı. Her bir tüpten 25-30 µl kadar alınarak jel kuyucuklarına yüklendi. Sonra 120 V elektrik akım uygulanarak elektroforez işlemi

yapıldı ve görüntüleme cihazı ile oluşan PCR ürünleri; 208 bp'lik fragmentler TT genotipi, 145 bp ve 63 bp'lik fragmentler CC genotipi, 208 bp, 145 bp ve 63 bp'lik fragmentler ise CT genotipi olarak değerlendirildi.

a) PCR Ortamı (10X)

Bidistile Su.....	170 µl
10x PCR Buffer (NH ₂ (SO ₄)).....	25 µl
dNTP Mix (2 mM).....	25 µl
Primer F (MDR1 F).....	5 µl
Primer R (MDR1 R).....	5 µl
25 mM MgCl ₂	15 µl
Taq DNA Polimeraz.....	2 µl
Genomik DNA.....	1 µl

b) PCR Şartları

94 °C	2 dk	} 30 döngü
94 °C	1,5 dk	
54 °C	1 dk	
72 °C	1.5 dk	
72 °C	7 dk	
+ 4 °C'de bekleme olarak düzenlendi.		

3.4.2. MDR1 geni mRNA düzeylerinin belirlenmesi

a) Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

1) RT-PCR'de kullanılan primerler;

- cDNA elde etmek için kullanılan primer oligo T;

PolyT 5'-TTTTTTTTTTTTTTT-3'

- MDR1 geni mRNA'sına özgü primerler;

ABCB1-F- 5'- CAG ACA GCA GGA AAT GAA GTT GAA- 3'

ABCB1-R- 5'- GCT TTC TGT CTT GGG CTT GT- 3' (61)

- İnternal kontrol olarak kullandığımız beta aktin geni mRNA'sına özgü primerler;

Beta Aktin F- 5'- GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT- 3'

Beta Aktin R- 5'- AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT- 3'

2) cDNA eldesi için hazırlanan PCR ortamı (1X) (İlk Aşama)

5XRT Buffer..... 4µl

dNTP.....10µl

polydT primer.....1µl

Revers Transkriptaz (20U/µl)..1µl

RNAse inhibitör(40U/µl).....0,5 µl

Su..... 12 µl

RNA..... 1 µl

Her bir örnek için son hacim 28-30 µl olacak şekilde hazırlandı.

3) cDNA eldesi için hazırlanan PCR şartları

37 °C'de 60 dk }
95 °C'de 5 dk } 1 döngü

buz üzerinde 15 dk bekletilerek cDNA elde edildi.

4) MDR1 Geni cDNA için kantitatif PCR ortamı (1X) (2. aşama)

Bidistile Su.....16 µl
10x PCR Buffer (NH₂(SO₄)).....2,5 µl
dNTP Mix (2 mM).....2,5µl
Primer F (ABCB1 F)0,3 µl
Primer R (ABCB1 R).....0,3 µl
25 mM MgCl₂1,5 µl
Taq DNA Polimeraz (5u/µl).....0,2 µl
cDNA..... 3 µl

Her bir örnek için, son hacmi 24 µl olacak şekilde hazırlandı.

5) Kantitatif PCR Şartları

95 °C'de 2 dk
95 °C'de 45 sn }
59 °C'de 1 dk } 35 döngü
72 °C'de 1,5 dk }
72 °C'de 7 dk

+ 4 °C'de bekleme olarak hazırlandı.

6) Beta Aktin Geni cDNA için kantitatif PCR ortamı (1X) (2. aşama)

Bidistile Su.....	16 µl
10x PCR Buffer (NH ₂ (SO ₄)).....	2,5 µl
dNTP Mix (2 mM).....	2,5 µl
Primer F (BRT).....	0,3 µl
Primer R (BRT).....	0,3 µl
25 mM MgCl ₂	1,5 µl
Taq DNA Polimeraz (5u/µl)....	0,2 µl
cDNA.....	3 µl

Her bir örnek için, son hacmi 24 µl olacak şekilde hazırlandı.

7) Kantitatif PCR Şartları

95 °C'de	2 dk	} 35 döngü
95 °C'de	45 sn	
62 °C'de	1 dk	
72 °C'de	1,5 dk	
72 °C'de	7 dk	

+ 4 °C'de bekleme olarak hazırlandı.

MDR1 geni (160 bp) ve β Aktin genine (202 bp) ait RT-PCR ürünleri, etidyum bromid içeren %3'lük agaroz jel ile 120 V elektrik akımı kullanılarak elektroforez işlemi yapıldı. Bantlar, “Vilber Lourmat Marne La Vallée, France” marka jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarıldı ve “Scion Image Beta 4.03” programı kullanılarak MDR1 geni mRNA yoğunlukları ile β aktin geni mRNA yoğunlukları değerlendirildi. “Scion Image Beta 4.03” programı kullanılarak belirlenen MDR1 geni ve β aktin geni mRNA yoğunlukları birbirine oranlandı.

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 11,5) Paket Programı kullanılarak yapıldı. MDR1 geni C3435T polimorfizminin genotip dağılımının Hardy Weinberg dengesinde olup olmadığı belirlendi. MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranı normal dağılıma uygunluk kontrolünde Shapiro Wilks testi kullanıldı ve normal dağılıma sahip olmadığı gözlemlendi. Bu nedenle iki grup karşılaştırmasında, Mann Whitney U Testi kullanıldı. İki'den fazla bağımsız grup karşılaştırmalarında (genotip ve mRNA düzeyi/ β aktin mRNA düzeyi oranı) Kruskal Wallis ve anlamlı farklılık olan grupların belirlenmesinde Dunn çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Tanıtıcı istatistik olarak frekans, yüzde ve medyan (% 25 - % 75'lik persantiller) değerleri verilmiştir.

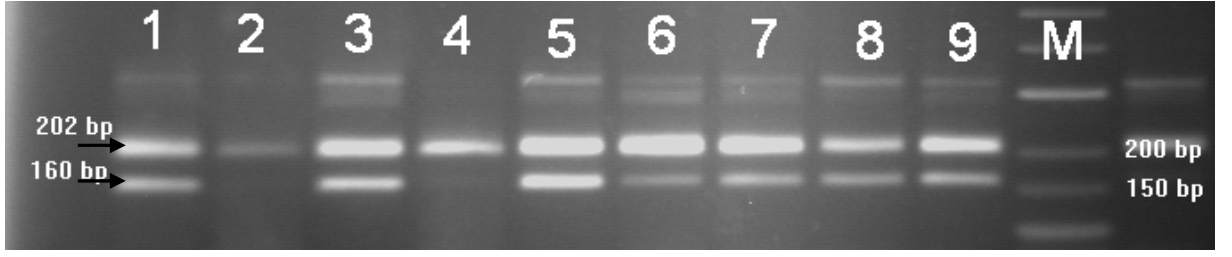
4. BULGULAR

Bu çalışmada, ALL hastalarında MDR1 geni mRNA düzeyleri ile MDR1 geni C3435T polimorfizmi arasındaki ilişkiyi belirlemek için, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı'na başvuran ALL tanılı ve kemoterapi tedavisi görmekte olan toplam 53 birey alınarak hasta grubu oluşturuldu. Hasta grubuna ait bireylerin yaş ortalaması $7,398 \pm 4,1354$ olarak belirlendi.

Hasta grubuna ait MDR1 geni mRNA düzeyleri, RT-PCR yöntemi ve “Scion Image Beta 4.03” programı kullanılarak tespit edildi. PCR ve RFLP yöntemleri kullanılarak MDR1 geni C3435T polimorfizmi alel ve genotipleri belirlendi.

4.1. ALL Hasta Grubuna Ait MDR1 Geni mRNA Düzey Bulguları

Asid Guanidinyum-Fenol-Kloroform (AGPC) yöntemi kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra RT-PCR ile cDNA'lar elde edildi. Elde edilen cDNA'larla yapılan PCR sonrası MDR1 mRNA düzeylerine ait bantlar “Vilber Lourmat Marne La Vallée, France” marka jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarıldı, “Scion Image Beta 4.03” kullanılarak değerlendirildi (Şekil 4.1.). MDR1 geni mRNA yoğunlukları (160 bp), internal kontrol β aktin geni mRNA yoğunlukları (202 bp) ile karşılaştırılıp oranlanarak MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi değerlendirildi.



Şekil 4.1. MDR1 geni ve internal kontrol beta aktin geni cDNA'larının elektroforez sonrası fotoğrafı; M: DNA Marker, 1-9: bireylere ait MDR1 geni (160 bp) ve beta aktin geni (202 bp) cDNA fragmentleri

Cinsiyete göre MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranı kıyaslandığında % 25'lik ve % 75'lik persantillere göre kızlarda medyan değeri 0,860 (0,690-0,990) iken, erkeklerde bu değer 0,840 (0,725-1,065) olarak belirlendi (Çizelge 4.1.). Cinsiyet ile MDR1 geni mRNA düzeyi/ β aktin mRNA düzeyi oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p= 0,922$).

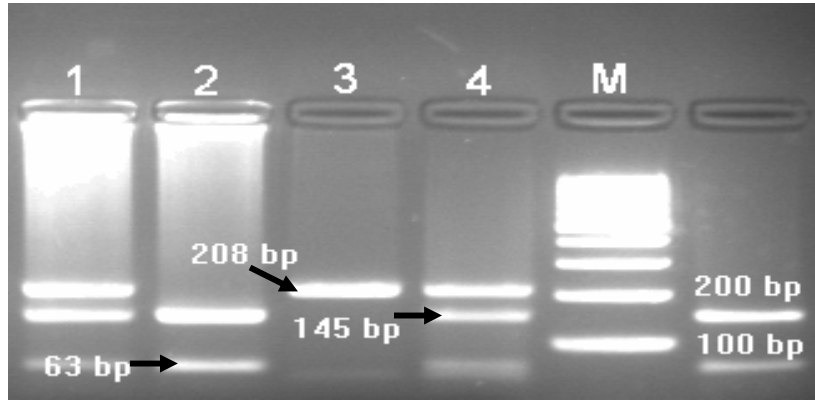
Çizelge 4.1. MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranı ile cinsiyetin karşılaştırılması

	CİNSİYET				P=0,922
	KIZ		ERKEK		
	Medyan	25 -75 P	Medyan	25 -75 P	
Ekspresyon	0,860	0,690-0,990	0,840	0,725-1,065	

P: Persantil

4.2. ALL Hasta Grubuna Ait MDR1 Geni C3435T Polimorfizminin Genotip Dağılımı ve Alel Frekans Bulguları

MDR1 geninin 26. ekson bölgesinde bulunan C3435T polimorfizmini belirlemek için elde edilen PCR ürünleri, *Mbo I* enzimi ile kesildi. Kesilen PCR ürünlerinin % 3'lük agaroz jelle elektroforezi sonrasında, 145 bp ve 63 bp'lik fragmentlere sahip bireyler homozigot CC, 208 bp'lik fragmentlere sahip bireyler homozigot TT ve 208 bp, 145 bp, 63 bp'lik fragmentlere sahip bireyler ise heterozigot CT genotipine sahip olarak değerlendirildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. MDR1 geni C3435T polimorfizmine ait alellerin elektroforez sonrası fotoğrafı. M: DNA marker; 1. ve 4. örnek CT, 2. örnek CC, 3. örnek TT

Hasta grubundaki toplam 53 bireyden 2'si genomik DNA'ları elde edilemediğinden çalışmanın "ALL Hasta Grubuna ait MDR1 Geni C3435T Polimorfizmi Genotip Dağılımı ve Alel Frekansı Bulguları" bölümüne dahil edilmedi. Hasta grubuna ilişkin MDR1 geni C3435T polimorfizmi genotipleri dağılımı toplam 51 kişiden 13'ü CC genotipine (% 25,5), 27'sinin CT genotipine (% 52,9), 11'i (% 21,6) ise TT genotipine sahip olarak belirlendi (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Hasta grubuna ait MDR1 geni C3435T polimorfizmi genotip dağılımları

Genotip	Hasta Grubu N (%)
CC	13 (% 25,5)
CT	27 (% 52,9)
TT	11 (% 21,6)
Toplam	51 (% 100)

N: Birey Sayısı,

Hasta grubuna ilişkin CC, CT, TT genotip dağılımının Hardy Weinberg dengesinde olduğu gözlemlendi ($p=0,665$).

ALL hasta grubuna ait alel frekansları, 53 (% 52) C aleli ve 49 (% 48) T aleli olarak belirlendi (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Hasta grubuna MDR1 geni C3435T polimorfizmi ait polimorfizmi alel frekansları

Alel	Hasta Grubu N (%)
C	53 (% 52)
T	49 (% 48)
Toplam	102 (% 100)

n: Alel sayısı

Hasta grubu C veya T aleline sahip olup olmaması açısından değerlendirildi ve hasta grubu bireylerinde 40 (% 78,4) kişi CC veya CT genotipine, 11 (% 21,6) kişinin ise TT genotipine sahip olarak belirlendi (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Hasta grubunun C veya T aleline sahip olması açısından değerlendirilmesi

C veya T Aleline Sahip Olma	Hasta Grubu N (%)
CC+CT	40 (% 51,28)
TT+CT	38 (% 48,72)

N: Birey sayısı

4.3. MDR1 Geni mRNA Düzeyleri ile C3435T Polimorfizmi Genotip

Dağılımları Arasındaki İlişkiye Ait Bulgular

ALL hasta grubuna ait MDR1 C3435T genotip dağılımları MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları bakımından kıyaslandı. MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranı, % 25'lik ve % 75'lik persantillere göre CC genotipine sahip 13 kişide medyan değeri 0,880 (0,742 - 1,122), CT genotipine sahip 27 kişide medyan değeri 0,910 (0,765 - 1,280), TT genotipine sahip 11 kişide ise medyan değeri 0,720 (0,532 - 0,823) bulundu (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Hasta grubunda MDR1 C3435T genotip dağılımları ile MDR1 mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranlarının karşılaştırılması (p=0,026).

		mRNA Düzeyi/Beta Aktin mRNA Düzeyi Oranı	
Genotip	Hasta Grubu	Medyan	25-75 P
CC	13	0,880	0,742-1,122
CT	27	0,910	0,765-1,280
TT	11	0,720	0,532-0,823

P:Persantil

MDR1 genotip dağılımları ile MDR1 geni mRNA düzeyi/ β aktin mRNA düzeyi oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p=0,026$). CT genotipine sahip bireylerde MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları TT genotipine sahip bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p=0,021$).

Hasta grubunda homozigot TT genotipine sahip olan bireyler ile homozigot CC veya heterozigot CT genotipe sahip olan bireyler MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları bakımından karşılaştırıldı. % 25'lik ve %75'lik persentillere göre CC veya CT genotipine sahip 40 bireyin MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranı medyan değeri 0,895 (0,75-1,257), TT genotipine sahip olan 11 bireyin medyan değeri ise 0,72 (0,52-0,83) olarak belirlendi (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. Homozigot TT genotipine sahip olma ile homozigot CC veya heterozigot CT genotipe sahip olan bireylerin MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranlarının karşılaştırılması ($p=0,010$)

	Genotip	Hasta Grubu N (%)	Medyan	25-75 P
	CC+CT	40 (% 78,4)	0,895	0,75-1,25
Ekspresyon	TT	11(% 21,6)	0,72	0,52-0,83

N: Birey Sayısı

P: Persantil

Hasta grubunda homozigot TT genotipine sahip olan bireyler ile homozigot CC veya heterozigot CT genotipe sahip olan bireyler MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları bakımından karşılaştırıldığında, homozigot CC veya heterozigot CT genotipe sahip olan bireylerde MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları TT genotipine sahip bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p= 0,010$).

5. TARTIŞMA

ALL çocukluk çağında oldukça yaygın görülen bir lösemi tipi olup, tedavisinde kemoterapi önemli yer tutmaktadır. ALL’li çocukların yaklaşık %80’i tedaviye olumlu yanıt verirken, bir kısmında ise tedaviye karşı direnç gözlenmektedir (62). Çoklu ilaç direnci olarak adlandırılan bu direnç kemoterapide önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Kemoterapi sürecini etkileyen birçok gen polimorfizmi olduğu düşünülmüştür (62). Bu gen polimorfizimleri içinde, hastaların çeşitli MDR1 substratlarına karşı farklı tepkiler vermesini sağlayan MDR1 geninin 26. eksonunda yer alan C3435T polimorfizmi önemli yer tutmuştur. Bu polimorfizmin, MDR1 geninde herhangi bir amino asit değişikliğine neden olmadan, MDR1 geni mRNA ekspresyonu ve P-gp aktivitesini çeşitli mekanizmalarla etkilediği düşünülmektedir. Bu mekanizmalardan ilkinde, C3435T polimorfizmi ile MDR1 geninde bulunan diğer polimorfizimler (promotor/enhancer bölgede bulunanlar, T129C veya G2677T/A gibi) arasında bir ilişki olduğu belirtilmektedir (56). İkinci mekanizmada, MDR1 C3435T polimorfizminin translasyonel etkinliği azaltabileceğinden söz edilmektedir. Üçüncü mekanizmada ise, bu polimorfizmin mRNA’nın işlenmesini ve translasyonel kontrolü değiştirdiği belirtilmiştir. Aynı zamanda C3435T polimorfizminin posttranskripsiyonel modifikasyonları etkilediği veya mRNA’nın işlenmesinde önemli olduğu düşünülen bir dizi ile bağlantılı olabileceği de düşünülmektedir. Bu polimorfizmin P-gp ekspresyon/aktivitesini değiştirmesi kişinin tedaviye yanıtını etkileyerek ilaç direncinin gelişimine sebep olmaktadır (56).

Çalışmamız, MDR1 geni C3435T polimorfizmi ile MDR1 geni mRNA düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak için, ALL tanısı almış ve kemoterapi görmekte olan 53 hasta bireyle bir çalışma grubu oluşturularak yapıldı.

Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler, SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 11,5) Paket Programı ile değerlendirildi.

Akut lenfoblastik lösemili hasta grubuna ilişkin MDR1 genotip dağılımları ile MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p=0,026$). CT genotipine sahip bireylerdeki MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranlarının TT genotipine sahip bireylerinkine göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p=0,021$).

Hasta grubumuzda yüksek ekspresyon düzeyi gözlenmesine rağmen bireylerin çoğunluğu tedaviye yanıt vermektedir. Ekspresyon seviyeleri yüksek gözlenirse de bireylerde remisyona sağlanabileceği söylenebilir. Bu konu ile ilgili Pirker ve arkadaşlarının (63), akut miyeloid lösemili hastalarda MDR1 gen ekspresyonunun rolünü araştırmak için yaptıkları çalışmada, blast hücrelerinin teşhis aşamasında belirlenen mRNA düzeylerinin tedavi sonucuyla ilişkili olduğu gözlenmiştir. Hastaların % 29'unda MDR1 mRNA seviyelerinin negatif, %71'inde ise mRNA seviyelerinin pozitif olduğu bulunmuştur. Bununla beraber MDR1 mRNA seviyesinin negatif gözlendiği hastalarda indüksiyon tedavisine yanıtta tam remisyona oranı % 89 iken, pozitif hastalarda bu oran % 53 olarak bulunmuştur.

Aynı zamanda CC ve CT genotipine sahip bireylerin yüksek ekspresyona sahip olmaları ve ilaç direnci göstermeleri beklenmesine rağmen, remisyondaki hastalarda CC ve CT genotiplerine sahip bireylerin sayısının çok olması ve tedaviye olumlu yanıt alınması, genotip ile mRNA/protein seviyeleri arasındaki ilişkinin çeşitli faktörlerden etkilendiği (çevre, transkripsiyonel regülasyon gibi) ve polimorfizmin etkisinin baskılanmış olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte mRNA ekspresyon seviyesi yüksek gözlenirse de, post translasyonel modifikasyonlar veya tedavide kullanılan çeşitli ilaçların P-gp aktivite düzeyinin değişmesine sebep olduğu düşünülmektedir (64,65). Ayrıca P-gp'nin 3 boyutlu yapısının bozulması, proteinin membrana etkin bir şekilde yerleşememesi, ATP bağlayıcı domainlerin bloklanması veya proteinin transmembran segmentlerinin transport için oluşturduğu kanalların çeşitli substratlarca kapatılması ile P-gp aktivitesinin değişebileceğini ve böylece ilacın hücre dışına atılımı engellenerek, bireyin tedaviye olumlu yanıt verebileceğini söyleyebiliriz. Çalışmamızda yüksek ekspresyon seviyeleri gözlenen hasta bireylerin tedaviye yanıt vermelerine rağmen, ileride erken relaps gelişim risklerinin yüksek olabileceği düşünülebilir.

Dong ve arkadaşları (66) MDR1 gen ekspresyonunun akut lösemideki önemini ortaya koymak için yaptıkları çalışmada, tam remisyon gösteren hastalarda gittikçe artan mRNA seviyelerinin erken relaps gelişimine yol açtığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda yüksek mRNA düzeyine sahip hastalarda P-gp ekspresyon seviyesinin belirlenmesi önerilmektedir. Böylece mRNA ekspresyon düzeyinin P-gp ekspresyon düzeyini ne şekilde yansıttığı daha iyi anlaşılabilir, hastanın tedaviye yanıtının nasıl olacağı konusunda daha doğru bilgiye ulaşılabilir.

Hoffmeyer ve arkadaşlarının (10) yaptığı çalışmada, 3435 pozisyonundaki C→T dönüşümü ile intestinal P-gp ekspresyonunun azaldığı ve digoksin ilaç kullanımının arttığı gözlenmiş ve CC genotipine sahip bireylerde ise intestinal P-gp seviyesinin arttığı ve intestinal digoksin ilaç alınımının azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca MDR1 geni C3435T polimorfizmi ile MDR1 geni mRNA düzeylerini karşılaştırmış ve CC genotipine sahip bireylerde mRNA ekspresyonunu TT genotipine sahip bireylerden daha yüksek bulmuşlardır. CT genotipine sahip bireylerdeki ekspresyon düzeyinin ise orta seviyede olduğunu gözlemişlerdir

Sakaeda ve arkadaşları ise Hoffmeyer'in yaptığı çalışmanın aksine T alelini azalan digoksin serum konsantrasyonu ile ilişkili bulmuştur (67).

Owen ve arkadaşları (68), C3435T polimorfizmi ile hepatik P-gp ekspresyonu arasında bir ilişki olup olmadığına bakmışlar ve herhangi bir ilişkiye rastlamamışlardır. Aynı zamanda 21 sağlıklı Kafkaslı bireyden TT veya CT genotipine sahip olanların kan hücrelerindeki mRNA seviyelerinin CC genotipine sahip bireylerinkinden daha az olduğunu bildirmişlerdir.

Baran ve arkadaşları (9), AML'de ilaç rezistansını araştırmak için in vitro model olarak HL60 hücre hattıyla çalışmışlar ve hücre hattına artan konsantrasyonlarda vinkristin uygulamışlardır. Sonuçlar, yüksek vinkristin konsantrasyonlarında HL60 hücrelerinin hayatta kalabildiğini göstermiştir ve bu direnç MDR1 geninin aşırı ekspresyonu ile açıklanmıştır.

Efferth ve arkadaşları (16), 20 T-ALL hücre hattı, 53 ALL hastası ve 7 sağlıklı bireyle yaptığı çalışmada, C3435T polimorfizminin ilaç direnci ve ALL prognozu üzerindeki etkisini analiz etmiş ve C3435T polimorfizmi MDR1 mRNA ekspresyonu arasında herhangi bir ilişki bulamamışlardır.

Çalışmamızda, hasta grubunda homozigot TT genotipine sahip olan bireyler ile homozigot CC veya heterozigot CT genotipe sahip olan bireyler MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları bakımından karşılaştırıldı. Homozigot CC veya heterozigot CT genotipe sahip olan bireylerde MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları TT genotipine sahip bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,010$).

Hasta grubuna ilişkin MDR1 geni C3435T polimorfizmi CC, CT, TT genotip dağılımının Hardy Weinberg dengesinde olduğu gözlemlendi ($p=0,665$).

Jamroziak ve arkadaşları (2006), 180 AML hastasıyla yaptığı çalışmada, C3435T polimorfizminin ABCB1 gen ekspresyonu ve P-gp ekspresyonu üzerinde etkili olup olmadığını incelemiştir. Fakat ABCB1 genotipleri (CC, CT, TT) ile ABCB1 gen ekspresyonu ve P-gp ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulamamıştır (69).

Illmer ve arkadaşları (70), CC genotipine sahip AML hastalarının kemik iliği örneklerinden elde edilen mononükleer hücrelerin düşük MDR1 mRNA seviyesine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Jamroziak ve arkadaşları (2005), 44 Kafkaslı ALL hastasıyla yaptığı başka bir çalışmada ise, C3435T polimorfizminin MDR1 geni üzerinde fonksiyonel ve prognostik rolünü araştırmış ve kemoterapi sonucunda ALL blast hücrelerindeki MDR1 gen ekspresyonu, P-gp ekspresyonu ve aktivitesinin farklı MDR1 genotipi taşıyan hastalarda farklı olduğunu gözlemiştir. C3435T polimorfizmine ait CT, TT ve CC genotiplerinin ekspresyon seviyeleri üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını gözlemiştir. Ayrıca çalışma sonuçları C3435T polimorfizminin yetişkin ALL gelişimini belirlemede major bir belirleyici olmadığını göstermiştir (71).

Çalışmamızda, cinsiyete göre MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranı kıyaslandı. Cinsiyet ile MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0,922$).

Thörn ve arkadaşları (72), gastrointestinal sistemde MDR1 mRNA düzeylerine bakmışlardır. Cinsiyetle kıyasladıklarında mRNA düzeylerinin değişmediğini gözlemişlerdir.

Hasta grubundaki 50 bireyin remisyonda ve sadece 3 kişinin relapsda olması nedeniyle tedaviye yanıtın derecesiyle ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilemedi. Fakat çalışmamızda MDR1 mRNA düzeyleri ile MDR1

C3435T polimorfizmi genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunması, MDR1 C3435T polimorfizminin tedaviye yanıtta prognostik bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotez, örnek genişliğinin (özellikle de relaps hasta sayısı) artırılması ile istatistiksel olarak daha anlamlı hale gelebilir ve ileriki çalışmalar için yol gösterici olabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

ALL hasta grubuna ait MDR1 C3435T genotip dağılımları MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları bakımından kıyaslandı. MDR1 genotip dağılımları ile MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p=0,026$). CT genotipine sahip bireylerde MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları TT genotipine sahip bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p=0,021$).

Hasta grubunda homozigot TT genotipine sahip olan bireyler ile homozigot CC veya heterozigot CT genotipe sahip olan bireyler MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları bakımından karşılaştırıldı. Homozigot CC veya heterozigot CT genotipe sahip olan bireylerde MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranları TT genotipine sahip bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p= 0,010$).

Cinsiyete ile MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranı kıyaslandı. Cinsiyet ile MDR1 geni mRNA düzeyi/beta aktin mRNA düzeyi oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p= 0,922$).

Hasta grubundaki toplam 53 bireyden 2'si genomik DNA'ları elde edilemediğinden çalışmanın "ALL Hasta Grubuna ait MDR1 Geni C3435T Polimorfizmi Genotip Dağılımı ve Alel Frekansı Bulguları" bölümüne dahil edilmedi. Hasta grubuna ilişkin MDR1 geni C3435T polimorfizmi genotipleri dağılımı belirlendi ve Hardy Weinberg dengesinde olduğu gözlemlendi ($p=0,665$).

Kemoterapi tedavisi gören ALL'li hasta grubunun periferik kan lenfositlerindeki MDR1 mRNA düzeyleri ve MDR1 geni C3435T polimorfizmi ile tedaviye yanıt arasında bir ilişki olup olmadığının araştırılması amacıyla yaptığımız çalışma sonucunda, MDR1 C3435T polimorfizminin kemoterapi tedavisine karşı yanıtta önemli olabileceği ve kişiye özgü tedavi yöntemlerinin gelişmesine ilişkin yapılan çalışmalara ışık tutabileceğini önerebiliriz.. Ayrıca C3435T polimorfizmi ile MDR1 genine ilişkin

diğer polimorfizmlerin beraber çalışılması veya MDR1 gen haplotip analizinin yapılması gelecekte kişiye özgü tedavi yöntemlerinin uygulanmasında faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Kemoterapi rezistansı tedavide karşılaşılan önemli bir sorundur. Direnç tedaviden önce var olabildiği gibi tedavi aşamasında da gelişebilmektedir. Tedavi aşamasında direnç oluşumu uygulanan tedavinin P-glikoprotein ekspresyonunu artırmasıyla oluşmaktadır. Bu durumda hastalarda oluşan direncin tedavi kaynaklı mı yoksa daha önceden var olan bir direnç mi olup olmadığını anlamak için, ALL teşhisi konmuş hastalardan oluşan bir çalışma grubu oluşturulmalıdır. Bu hasta grubundan teşhis ve tedavi aşaması gibi belirli zamanlarda kan alınarak C3435T polimorfizmine ait genotip, mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ve hastanın tedaviye nasıl yanıt verdiği bakılması önerilmektedir. Ayrıca P-gp aktivitesinde ve P-gp ekspresyonunda tedavi sırasında oluşabilecek değişikliklerden dolayı, tedavinin belirli aşamalarında bireyin “Akım Sitometri” yöntemi ile P-gp aktivite ve ekspresyon düzeyinin belirlenmesi önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Cortes JE, Kantarjian HM.** Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer.* **1995**; 76 (12): 2393-417.
2. **Apak H.** Çocukluk çağı lösemileri. *Türk Pediatri Arşivi.* **2006**; 41: 189-96.
3. **Yang Xie, M.P.H. Stella Xie Y, Davies SM, Xiang Y, Robison LL, Ross JA.** Trends in Leukemia Incidence and Survival in the United States (1973–1998). *Cancer.* **2003**; 97: 2229-35.
4. **Sinnett D, Laobuda D, Krajinovic M.** Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers the childhood leukemia experience. *Fam Cancer.* **2006**; 5 (1): 35-47.
5. <http://www.ufscc.ufl.edu> Erişim Tarihi: **04.07.2009**
6. **Valera ET, Scrideli CA, Queiroz RG, Mori BM, Tone LG.** Multiple drug resistance protein (MDR1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med J.* **2004**;122 (4): 166-71.
7. **Jiang EZ, Chang YJ, Lee JW, Lee WK, Kim JS, Sohn SK, Lee KB, Suh JS.** Multi-drug resistance (MDR1) gene expression in de novo acute leukemia cells: correlations with CD surface markers and treatment outcome. *J Korean Med Sci.* **1998**;13 (6): 617-22.
8. **Huh HJ, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Chi HS, Lee JH, Lee KH, Seo JJ, Moon HN, Ghim T.** Prognostic Significance of Multidrug Resistance Gene 1 (MDR1), Multidrug Resistance-related Protein (MRP) and Lung Resistance Protein (LRP) mRNA Expression in Acute Leukemia. *J Korean Med Sci.* **2006**; 21: 253-8.
9. **Baran Y, Gündüz U, Ural, AU.** Expression of multi drug resistance (MDR1) gene in human promyelocytic leukemia cell line selected with vincristine. *Turk J Cancer* **2005**; 35 (2): 88-92.
10. **Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U.** Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**; 97 (7): 3473-8.
11. **Hattori H, Suminoe A, Wada M, Koga Y, Kohno K, Okamura J, Hara T, Matsuzaki A.** Regulatory polymorphisms of multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with the development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* **2007**; 31 (12): 1633-40.

12. **Krzysztof J, Ewa B, Barbara C, Agnieszka J, Marek M, Tadeusz R.** No Influence of 3435C>T ABCB1 (MDR1) Gene Polymorphism on Risk of Adult Acute Myeloid Leukemia and P-glycoprotein Expression in Blast Cells. *Ther Drug Monit.* **2006**; 28: 707–711.
13. **Jamroziak K, Mlynarski W, Balcerczak E, Mistygacz M, Trelinska J, Mirowski M, Bodalski J, Robak.** Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *T. Eur J Haematol.* **2004**; 72 (5): 314-21.
14. **Taylor GM.** Immunogenetics and the aetiology of childhood leukaemia. *Arch Dis Child.* **1994**; 70 (2): 77- 81.
15. **Jensen CD, Block G, Buffler P, Ma X, Selvin S, Month S.** Maternal dietary risk factors in childhood acute lymphoblastic leukemia (United States). *Cancer Causes Control.* **2004**; 15 (6): 559-70.
16. **Efferth T, Sauerbrey A, Steinbach D, Gebhart E, Drexler HG, Miyachi H, Chitambar CR, Becker CM, Zintl F, Humeny A.** Analysis of single nucleotide polymorphism C3435T of the multidrug resistance gene MDR1 in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol.* **2003**; 23 (2): 509-17.
17. **Atay AA, Kürekçi AE, Kesik V, Kılıç S, Gülgün M, Özcan O, Gökçay E.** Akut lenfoblastik lösemili olgularımızın retrospektif analizi. *Gülhane Tıp Dergisi* **2005**; 47: 183-186.
18. **Greaves M.** Childhood leukaemia. *BMJ.* **2002**; 324 (7332): 283-7.
19. **Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, Downing JR, Willman CL, Reed JC.** Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* **2003**: 102-31.
20. **Yakut T, Gülten T.** Çocukluk çağı Lösemilerindeki Genetik Değişiklikler ve Klinik Önemi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* **2005**; 31 (1): 57-62.
21. **Pui CH.** Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am.* **1997**; 44 (4): 831-46.
22. **Belson M, Kingsley B, Holmes A.** Risk factors for acute leukemia in children. *Environ Health Perspect.* **2007**; 115 (1): 138-45.
23. **Pombo de Oliveira MS, Awad el Seed FE, Foroni L, Matutes E, Morilla R, Luzzatto L, Catovsky D.** Lymphoblastic leukaemia in Siamese twins: evidence for identity. *Lancet.* **1986**; 2 (8513): 969-70.
24. **Dördelmann M, Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Graf N, Schott G, Lampert F, Harbott J, Niemeyer C, Ritter J, Dörffel W, Nessler G, Kühl J, Riehm H.** Down's syndrome in childhood Acute lymphoblastic leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in four consecutive BFM trials. Berlin-Frankfurt-Münster Group. *Leukemia.* **1998**; 12 (5): 645-51.

25. **Willis AE, Lindahl T.** DNA ligase I deficiency in Bloom's syndrome. *Nature*. **1987**; 325 (6102): 355-7.
26. **Swift M.** Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. *Nature*. **1971**; 230 (5293): 370-3.
27. **Shearer P, Parham D, Kovnar E, Kun L, Rao B, Lobe T, Pratt C.** Neurofibromatosis type I and malignancy: review of 32 pediatric cases treated at a single institution. *Med Pediatr Oncol*. **1994**; 22 (2): 78-83.
28. **Kaye SA, Robison LL, Smithson WA, Gunderson P, King FL, Neglia JP.** Maternal reproductive history and birth characteristics in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* **1991**; 68: 1351-5.
29. **Faderl S, Jeha S, Kantarjian MH.** The Biology and Therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer*. **2003**; 98: 1337-54.
30. **Rubnitz JE, Pui CH. Leukemias.** In: Jameson JL. Ed. *Principles of molecular medicine*, 1st Ed. New York: Springer-Verlag, LLC, **1998**: 234.
31. **Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG.** Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Pizzo PA, Poplack DG, Eds. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2005**: 558
32. <http://sakur.uludag.edu.tr/dosya/FR-HYE-04-416-03.pdf>. **Erişim Tarihi: 02.05.2009.**
33. **Pui CH, Robison LL, Look AT.** Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. **2008**; 371 (9617): 1030- 43.
34. **Hayes JD, Wolf CR.** Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem J*. **1990**; 272 (2): 281-95.
35. **Marie JP, Legrand O.** Drug Resistance in Acute Leukaemia and Reversion. *Turk J Med Sci*. **2003**; 33: 271-9.
36. **Alexandrova R.** Multidrug Resistance and P-Glycoprotein. *Bulgarian Academy of Sciences*. **1998**; 1: 62-66.
37. **Sakaeda T.** MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet*. **2005**; 20 (6): 391-414.
38. **Mealey KL.** Therapeutic implications of the MDR1 gene. *J. vet. Pharmacol. Therap*. **2004**; 27: 257-264.
39. **Zhou SF.** Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*. **2008**; 38 (7-8): 802-32.

40. **Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM.** P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*. **2003**; 22 (47): 7468-85.
41. **Broxterman HJ, Pinedo HM, Kuiper CM, Kaptein LC, Schuurhuis GJ, Lankelma J.** Induction by verapamil of a rapid increase in ATP consumption in multidrug-resistant tumor cells. *Faseb J*. **1988**; 2 (7): 2278-2282.
42. **Azzaria M, Schurr E, Gros P.** Discrete Mutations Introduced in the Predicted Nucleotide-Binding Sites of the *mdr1* Gene Abolish Its Ability To Confer Multidrug Resistance. *Mol. Cell. Biol.* **1989**; 9 (12): 5289-97.
43. **Horio M, Gottesman MM, Pastan I.** ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1988**; 85 (10): 3580-4.
44. **Kaya P, Gündüz U, Arpacı F, Ural AU, Guran S.** Identification of polymorphisms on the MDR1 gene among Turkish population and their effects on multidrug resistance in acute leukemia patients. *Am J Hematol*. **2005**; 80 (1): 26-34.
45. **Sorrentino BP.** Gene therapy to protect haematopoietic cells from cytotoxic cancer drugs. *Nat Rev Cancer*. **2002**; 2 (6): 431-41.
46. **Dhooge CR, De Moerloose BM, Benoit YC, Van Roy N, Philippé, Laureys GG.** Expression of the MDR1 gene product P-glycoprotein in childhood neuroblastoma. *Cancer*. **1997**; 80 (7): 1250-7.
47. **Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM,** et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*. **1989**; 81 (2): 116-24.
48. **Weinstein RS, Jakate SM, Dominguez JM, Lebovitz MD, Koukoulis GK, Kuszak JR, Klusens LF, Grogan TM, Saclarides TJ, Roninson IB,** et al Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Res*. **1991**; 51 (10):2720-6.
49. **Borst P.** Genetic mechanisms of drug resistance. *Acta Oncol*. **1991**; 30 (1): 87-105.
50. **Fromm MF.** The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev*. **2002**; 54 (10): 1295-310.
51. **Linardi RL, Natalini CC.** Multidrug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs. *Ciência Rural*. **2006**; 36 (1): 336-341.
52. **Scotto KW, Johnson RA.** Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target. *MolInterv*. **2001**; 1 (2): 117-25.

53. <http://www.genecards.org>. Erişim Tarihi: 24.04.2009.
54. Haber DA. Multidrug resistance (MDR 1) in leukemia: is it time to test? *Blood*. 1992; 79 (2): 295-8
55. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Calmard-Oriol P, Tsuruo T, Troncy J, Treille D, Fiere D. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein (P-170) expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood*. 1992; 79 (2): 473-476.
56. Li YH, Wang YH, Li Y, Yang L. MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. *Yi Chuan Xue Bao*. 2006; 33(2): 93-104.
57. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA, McLeod HL. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics*. 2001; 11 (3): 217-21.
58. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to Genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 297 (3): 1137-43.
59. Chomeczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987; 162: 156-159.
60. Jamroziak K, Balcerzak E, Mlynarski W, Mirowski M, Robak T. Distribution of allelic variants of functional C3435T polymorphism of drug transporter MDR1 gene in a sample of Polish population. *Pol J Pharmacol*. 2002; 54 (5): 495-500.
61. Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B, Artursson P. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 299 (1): 164-70.
62. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998; 339(9): 605-15.
63. Pirker R, Wallner J, Geissler K, Linkesch W, Haas OA, Bettelheim P, Hopfner M, Scherrer R, Valent P, Havelec L, et al. MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 1991; 83(10): 708-12.
64. Szabo K, Bakos E, Welker E, et al. Phosphorylation site mutations in the human multidrug transporter modulate its drug-stimulated ATPase activity. *J Biol Chem* 1997; 272: 23165-71.
65. Toffoli G, Corona G, Gigante M, Boiocchi M. Inhibition of Pgp activity and cell cycle-dependent chemosensitivity to doxorubicin in the multidrug-resistant LoVo human colon cancer cell line. *Eur J Cancer*. 1996; 32A(9): 1591-7.

66. **Dong Z, Luo J, Xu W.** Clinical significance of multidrug resistance gene(mdr1) expression in patients with acute leukemia. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* **1997**; 19(1): 72-5.
67. **Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T, Morita Y, Tamura T, Aoyama N, Hirai M, Kasuga M, Okumura K.** MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res.* **2001**; 18 (10): 1400-4.
68. **Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK, Pirmohamed M.** Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. *Br J Clin Pharmacol.* **2005**; 59 (3): 365-70.
69. **Jamroziak K, Balcerczak E, Cebula B, Janus A, Mirowski M, Robak T.** No influence of 3435C>T ABCB1 (MDR1) gene polymorphism on risk of adult acute myeloid leukemia and P-glycoprotein expression in blast cells. *Ther Drug Monit.* **2006**; 28 (5): 707-11.
70. **Illmer T, Schuler US, Thiede C, Schwarz UI, Kim RB, Gotthard S, Freund D, Schäkel U, Ehninger G, Schaich M.** MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res.* **2002**; 62 (17): 4955-62.
71. **Jamroziak K, Balcerczak E, Cebula B, Kowalczyk M, Panczyk M, Janus A, Smolewski P, Mirowski M, Robak T.** Multi-drug transporter MDR1 gene polymorphism and prognosis in adult acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacol Rep.* **2005**; 57 (6): 882-8.
72. **Thörn M, Finnström N, Lundgren S, Rane A, Löf L.** Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *Br J Clin Pharmacol.* **2005**; 60 (1): 54-60.

ÖZGEÇMİŞ

24.11.1982 yılında Mersin'in Tarsus ilçesinde doğdu. İlköğremini Tarsus Dumlupınar Hürriyet İlkokulu'nda, ortaokul ve lise öğrenimini ise Mersin Yusuf Kalkavan Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2006 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2006 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yapmaktadır.

