

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ÇOCUKLUK ÇAĞI ALL HASTALARININ İDAME
TEDAVİSİNDE KULLANILAN MERKAPTOPÜRİN
FARMAKOGENETİĞİ VE İLAÇ DOZLARI ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. İrem ELDEM

**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Leyla Zümrüt UYSAL**

**ANKARA
2016**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ÇOCUKLUK ÇAĞI ALL HASTALARININ İDAME
TEDAVİSİNDE KULLANILAN MERKAPTOPÜRİN
FARMAKOGENETİĞİ VE İLAÇ DOZLARI ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. İrem ELDEM

**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Leyla Zümrüt UYSAL**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 14L0230004 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2016**

KABUL VE ONAY

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı : İrem Eldem	Tarih: 23/05/2016
Anabilim/Bilim Dalı : Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zümrüt Uysal	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: <i>Gocukluk Çağı ALL Hastalarının İdame Tedavisinde Kullanılan Merkaptopürin Farmakogenetiği ve İlaç Dozları Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi</i>	
Tezin Niteliği: <input checked="" type="checkbox"/> Ana Dal Uzmanlık Tezi <input type="checkbox"/> Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu: <input type="checkbox"/> 1 <input checked="" type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3	

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
<input checked="" type="checkbox"/> Kabulüne	
<input type="checkbox"/> Reddine	
<input type="checkbox"/> Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

Jüri Başkanı

Unvanı, Adı, Soyadı
Prof. Dr. Semra Atalay



Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı

Jüri Üyesi

Unvanı, Adı, Soyadı

Prof. Dr. Zümrüt Uysal
Çocuk Hematoloji Bilim Dalı



Jüri Üyesi

Unvanı, Adı, Soyadı

Prof. Dr. Fatma Gümrük
Hacettepe Üniversitesi
Çocuk Hematoloji Bilim Dalı



TEŞEKKÜR

Öncelikle, tezimin tüm aşamalarında ve asistanlık eğitimim boyunca bana yol gösteren, motive eden ve desteğini esirgemeyen tez danışman hocam Prof. Dr. L. Zümrüt Uysal'a,

Projedeki bilimsel katkıları ve ufkumu genişleten paylaşımları için Adli Tıp Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. N. Lale Şatıroğlu-Tufan'a ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nden Prof. Dr. Hilal Özdağ'a,

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca ikinci yuvamız haline gelen yeni çocuk hastanesini hayata geçiren Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Semra Atalay'a,

Büyük bir sorumluluk üstlenerek ilerlediğimiz bu yolda bilgi ve deneyimleriyle beni yetiştiren, hekimliği ve çocuk hekimi olmayı öğreten tüm saygıdeğer hocalarıma,

Tez konusunun geliştirilmesinde fikirlerini paylaşan Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Mehmet Ertem'e, Doç. Dr. D. Talia İleri'ye, Doç. Dr. Elif Ünal İnce'ye, Uzm. Dr. Hasan Fatih Çakmaklı'ya, tez hastalarımı toplamamda çok yardımcı olan Çocuk Hematoloji Laboratuvarı çalışanları Dr. Biyo. Hafize Gökçe ve Uzm. Biyo. Ceyda Gürman'a, Biyo. Ömür Pınar'a, Sosyal Pediatri Bilim Dalı'na ve Genel Poliklinik çalışanlarına,

Teze büyük katkıları olan ekip arkadaşlarım Adli Bilimler Enstitüsü'nden Biyo. Duygu Yavuz ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nden Dr. Özge Cumaoğulları'na,

Tez verilerinin istatistiksel analizinde emeği geçen, Yard. Doç. Dr. Recep Bindak, Yard. Doç. Dr. Beyza Doğanay Erdoğan ve Nazmiye Kurşun'a

Berber zevk alarak çalıştığım ve eğitimimde önemli katkıları olan yan dal uzmanlarımıza, uzmanlık yolunda beraber yürüdüğümüz asistan arkadaşlarıma ve hastanemizde uyum içinde çalıştığımız tüm intönlere, hemşirelere, memur ve yardımcı sağlık personeline,

Tez projesini destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Her zaman yanımda olan ve beni bugünlere getiren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızın lösemili çocuklara faydalı olması ve ailelere umut vermesi dileğimle...

Dr. İrem ELDEM



İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Akut Lösemi Tanımı ve Epidemiyolojisi	4
2.2. Akut Lösemi Etyopatogenezi	4
2.3. ALL Tanısı	7
2.3.1. Klinik Bulgular	7
2.3.2. Laboratuvar Bulguları.....	8
2.4. ALL Sınıflandırması.....	9
2.4.1. Morfolojik Sınıflama	9
2.4.2. İmmünolojik Sınıflama.....	10
2.4.3. Sitogenetik Sınıflama	12
2.5. ALL'de Prognoza Etki Eden Faktörler.....	12
2.6. ALL Tedavisi.....	16
2.7. ALL İdame Tedavisinde Kullanılan 6-MP ve MTX İlaçları ve Metabolizması	17
2.7.1. 6-MP Metabolizması ve Mekanizması	18
2.7.2. MTX Metabolizması ve Mekanizması	20
2.8. İdame Tedavisinde Kullanılan 6-MP ve MTX Dozlarının Ayarlanması ve Önemi	21
2.9. İlaç Yanıtına Farklılıkların Araştırılmasında Kullanılan Moleküler Belirteçler	22
2.10. Farmakogenetik Tanımı ve Çalışmalar.....	24
2.11. Pediatrik ALL Üzerine Farmakogenetik Çalışmalar	25

2.12. Tez Çalışmasında İncelenen Farmakogenetik Polimorfizmler.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Olguların Seçimi.....	32
3.2. Metod.....	34
3.2.1. Hasta İzlem Formunun Doldurulması	34
3.2.2. Hastalarda İdame Tedavisinin Düzenlenmesi ve Tolere Edilen 6-MP/MTX Dozlarının Belirlenmesi	34
3.2.3. Periferik Kan Örneklerinde Genetik Polimorfizmlerin Çalışılması	39
3.2.4. KASP Protokolü	39
3.3. Araştırmanın Bütçesi	42
3.4. Etik Kurul Onayı	42
3.5. İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR	44
4.1. Hastaların Demografik ve Lösemi Tanısına İlişkin Tanımlayıcı Özellikleri	44
4.2. Hastaların Lösemi İdame Tedavisi ve İlaç Yan Etkilerine İlişkin Tanımlayıcı Özellikler.....	47
4.3. Genetik Polimorfizmlere İlişkin Tanımlayıcı Analizler.....	52
4.4. Genetik Polimorfizmlerin İdame Tedavisindeki 6MP/MTX Dozları ile İlişkisi	56
4.5. Genetik Polimorfizmlerin İdame Tedavisinde Karşılaşılan Yan Etkiler ile İlişkisi	59
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇLAR.....	72
ÖZET	76
SUMMARY	77
KAYNAKLAR	78

SİMGELER VE KISALTMALAR

μL	: Mikrolitre
6-MMPM	: 6-metilmerkaptopürin metabolitleri
6-MP	: 6-merkaptopürin
6-TGN	: 6-tiyogüanin nükleotit
6-TIDP	: 6-tiyoinozin difosfat
6-TIMP	: 6-tiyoinozin monofosfat
6-TITP	: 6-tiyoinozin trifosfat
6-TXMP	: 6-tiyoksantin monofosfat
ABCC4	: ATP binding cassette
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut miyeloid lösemi
ATU	: Tiyürik asit
AZT	: Azatüyüpürin
BOS	: Beyin-omurilik sıvısı
CD	: Cluster of Differentiation
CNV	: Kopya sayısı değişimi (Copy number variation)
COG	: Children's Oncology Group
CPIC	: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium
DHF	: Dihydrofolat
DHFR	: Dihydrofolat redüktaz
dL	: Desilitre
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EBV	: Epstein-Barr virüs
FAB	: French-American-British sınıflaması
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
GIS	: Gastrointestinal sistem
GMPS	: Guanozin monofosfat sentetaz
GÜS	: Genitoüriner sistem
Hb	: Hemoglobin
HGPRT	: Hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz

HWE	: Hardy Weinberg dengesi (HW equilibrium)
Ig	: İmmünglobulin
IMPDH2	: İnozin monofosfat dehidrogenaz
ITPA	: İnozin trifosfat pirofosfataz
iAMP21	: Intrachromosomal amplification of chromosome 21
İBH	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı
KASP	: Rekabetçi allele özgü polimeraz zincir reaksiyonu (Competitive allele specific PCR)
LAP	: Lenfadenopati
LD	: Linkage disequilibrium (bağlantı dengesizliği)
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MAF	: Minör allel sıklığı (Minor allele frequency)
MLL	: Mixed lineage leukemia gene
mm³	: Milimetreküp
MPO	: Miyeloperoksidaz
MRH	: Minimal rezidüel hastalık
MTHFR	: Metilen tetrahidrofolat redüktaz
MTX	: Metotreksat
NCI	: National Cancer Institute
PACSN2	: Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2
PAS	: Periyodik asit schiff
PYGL	: Glycogen phosphorylase liver
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR: polymerase chain reaction)
RFC1	: Reduced folate carrier 1
SLCO1B1	: Solute carrier organic anion transporter family
SSS	: Santral sinir sistemi
TdT	: Terminal deoksinükleotidil transferaz
THF	: Tetrahidrofolat
TNP	: Tek nükleotit polimorfizm (SNP: Single nucleotide polymorphism)
TNS	: Total nötrofil sayısı
TPMT	: Tiyopürin S-metiltransferaz
ULN	: Upper limit normal
XO	: Ksantin oksidaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.	Türkiye’de 0-14 yaş grubundaki kız ve erkek çocuklarında en sık görülen kanserlerin bu grup içindeki dağılımı.....	5
Şekil 2.2.	B-ALL oluşumu ve relapsın genetik patogenezi	6
Şekil 2.3.	Akut lenfoblastik lösemide FAB sınıflaması.....	10
Şekil 2.4.	6-MP kimyasal yapısı	18
Şekil 2.5.	6-MP hücre içindeki metabolizması	19
Şekil 2.6.	MTX kimyasal yapısı	20
Şekil 2.7.	Folat ve metotreksat metabolizması	21
Şekil 3.1.	Araştırma grupları.....	33
Şekil 3.2.	Hasta izlem formu	35
Şekil 3.3.	COG protokolleri idame tedavisi şemaları	37
Şekil 3.4.	(A) KASP teknolojisi FRET kaset şematik görüntüsü, (B) KASP teknolojisi sonuç penceresi	40
Şekil 3.5.	(A) 384’lük derin kuyulu stok örnek <i>plate</i> ’den siyah-beyaz zebra çalışma <i>plate</i> ’lerine örneklerin dağıtılması (B) Örnek dağıtılmış çalışma <i>plate</i> ’lerine “ <i>repeater dispenser</i> ” pipet ile reaksiyon karışımının dağıtılması	41
Şekil 3.6.	KASP deneylerinde <i>plate</i> üzerini kapatmak için kullanılan K-seal cihazı.....	41
Şekil 3.7.	KASP deneylerinde kullanılan su banyosu temelli PZR’da kullanılan Hydrocyclers cihazı.....	42
Şekil 4.1.	İdame tedavisindeki (A) 6-MP ve (B) MTX yoğunlukları	48
Şekil 4.2.	Lösemi hastalarının son durumu.....	52
Şekil 4.3.	SLCO1B1 genindeki rs4149056 ve rs11045879 varyantlarının 6-MP dozu ile ilişkisinin kutu grafiği	58
Şekil 4.4.	SLCO1B1 genindeki rs4149056 ve rs11045879 varyantlarının MTX dozu ile ilişkisinin kutu grafiği	58

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1.	Çocukluk çağı ALL hastalarının tanı anında görülen klinik ve laboratuvar özellikleri	8
Tablo 2.2.	ALL’de immüfenotip sınıflandırma	11
Tablo 2.3.	Çocukluk çağı ALL’de sık görülen kromozom bozuklukları	13
Tablo 2.4.	ALL hastalarında risk sınıflaması.....	15
Tablo 2.5.	Tez kapsamında çalışılan 6-MP ve MTX metabolizmasında yer alan genetik varyantlar ve potansiyel klinik etkileri.....	31
Tablo 4.1.	Hastaların akut lösemi başvurusundaki tanımlayıcı özellikleri	45
Tablo 4.2.	Hastaların ilk başvurudaki tam kan sayımı ve biyokimyasal değerleri.....	45
Tablo 4.3.	Hastaların lösemi prognoz özelliklerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler	46
Tablo 4.4.	Hastalarda tespit edilen genetik değişiklikler ve prognozla ilişkisi.....	47
Tablo 4.5.	İdame tedavisine ilişkin tanımlayıcı özellikler	47
Tablo 4.6.	İdame tedavisinde hastaların kullandıkları ve COG AALL0331 protokolünde önerilen 6-MP ve MTX tedavi dozları	48
Tablo 4.7.	İdame tedavisindeki tam kan sayımı değerleri	49
Tablo 4.8.	İdame tedavisi sırasında karşılaşılan yan etkiler.....	49
Tablo 4.9.	Hastaların idame tedavisine ara verilmesine ilişkin tanımlayıcı istatistikler	50
Tablo 4.10.	İlaç dozları ve idame tedavisine ara verme durumunun cinsiyete göre dağılımı.....	51
Tablo 4.11.	İdame tedavisi sırasında görülen yan etkilerin cinsiyetlere göre dağılımı.....	51
Tablo 4.12.	Hasta ve kontrol grubundaki allel sıklıkları.....	53
Tablo 4.13.	Hasta ve kontrol grubunda tek nükleotit polimorfizm genotiplerinin dağılımı ve Hardy-Weinberg dengesi.....	55
Tablo 4.14.	Farmakogenetik polimorfizmlerin 6-MP ve MTX dozları ile ilişkisi.....	57
Tablo 4.15.	Hastalardaki genetik polimorfizmler ile idame tedavisi özellikleri.....	60

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) çocukluk çağında en sık görülen malign hastalıktır. Yaklaşık 150 yıl önce tanımlanmasına rağmen hastalığın tedavisinde %90'lara varan başarılı sonuçlara yavaş yavaş ulaşılmıştır. Bu iyi sonuçlara risk grubuna uygun çoklu kemoterapilerin yanı sıra, santral sinir sistemi profilaksisi ve destek tedavileri sayesinde gelinmiştir. Öte yandan hastaların bir kısmında özellikle idame tedavisi sırasında, ilaç toksisitesi nedeniyle dozlar azaltılmakta veya tedaviye zaman zaman ara verilmektedir. Çocukluk çağı ALL idame kemoterapisinde ana ilaçlar olarak, günlük 6-merkaptopürin (6-MP) ve haftalık metotreksat (MTX) bulunmaktadır. Bu ajanlara bağlı yan etkilerin sebepleri araştırılmakta ve bir kısmının genetik polimorfizmlerden etkilendiği bilinmektedir (1).

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'nda takip edilen hastaların önemli bir kısmını çocukluk çağı akut lösemisi oluşturmaktadır. Bölümümüzdeki akut lösemi hastalarının idame tedavisinin ana ilaçları olan 6-MP ve MTX'ı uluslararası protokolde önerilenden daha düşük dozlarda tolere ettikleri gözlenmiştir. Öte yandan, hastalığın nüks etmesini önleyecek, aynı zamanda ilaçların ağır yan etkilerinden koruyacak en uygun doz; hasta özelinde ayarlanmakta ve hastalar başarılı bir şekilde tedavi olmaktadır. Bu gözleme dayanarak tez kapsamında, hastaların farklı ilaç yanıtlarının genetik temellerini araştıran bir çalışma planlanmıştır.

İlaç etkinliğinin bireyler arasında farklılık gösterdiği yaklaşık 60 yıldır bilinmektedir (2). Sıtma ilacı ilişkili hemoliz, izoniazide bağlı nörotoksisite, enzim aktivitesindeki farklılıklardan kaynaklanan örneklerdir. İlaça verilen yanıt; farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerden, çevresel, fizyolojik faktörlerden ve hasta uyumundan etkilenmektedir. Çoklu faktörler söz konusu olduğu için, ilacın hastada yaratacağı etkileri önceden tahmin etmek zorlaşmaktadır. Bu bağlamda, klinik farmakolojinin bir alt dalı olan farmakogenetik alanındaki gelişmeler umut vericidir. Farmakogenetik, bireylerdeki farmakokinetik ve farmakodinamik farklılıkların genetik temellerini araştıran bilim dalıdır. Hastanın genetik şemasına

göre tedavinin özelleştirilmesine yol gösterir. Özellikle insan genom projesinin tamamlanmasından sonra bu alandaki çalışmalar büyük ivme kazanmıştır (3).

İlaç metabolizmasında yer alan proteinleri kodlayan genlerin dizilimindeki varyasyonlara farmakogenetik polimorfizm adı verilir. DNA dizisinde en sık görülen varyasyon, tek baz değişimi şeklindeki tek nükleotit polimorfizmlerdir (TNP). Bu polimorfizmlerin en önemli sonucu ilacın azalmış atılımına veya hızlı metabolizmasına bağlı oluşan toksisitedir. Polimorfizmlerin etkisine en önemli örneklerden biri tiyopürinlerdir. Tiyopürinlerden 6-MP ve ilaç öncülü olan azatiyopürin (AZT), hematopoetik dokularda tiyopürin S-metiltransferaz (TPMT) enzimi tarafından inaktive edilir. *TPMT* genindeki varyantlara bağlı düşük enzim aktivitesine sahip hastalar için, klasik dozda 6-MP kullanımının yaşamı tehdit edici miyelotoksisite ile sonuçlandığı, 2004 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından, ilaç kılavuzuna eklenmiştir. Bu ilaçları kullanacak hastalar için önceden TPMT'ye yönelik genotip veya fenotip incelemesi önerilmiştir. Böylece *TPMT* genotiplendirmesi, rutin klinik uygulamaya giren ilk test olmuştur. Aynı zamanda çocukluk çağı lösemilerinde klinik rehberlerde bulunan tek farmakogenetik belirteçtir (4).

Bu bilgiler ışığında, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'nda takipli ALL hastalarının, idame tedavisinde kullanılan 6-MP ve MTX'ı uluslararası protokollerde belirtilenden daha düşük dozda tolere etmelerinin farmakogenetik polimorfizmler ile ilişkili olabileceği hipotez edilmiştir. Çalışmaya; bölümümüzde 2007-2014 yıllarında tanı almış, idame tedavisi süren veya tedavisi tamamlanmış 48 tane çocuk ALL hastası dahil edilmiştir. Tezde, hasta ve sağlıklı gruptaki çocuklarda 6-MP ve MTX metabolizmasında yer alan 8 gendeki toplam 15 TNP'e, rekabetçi allele özgü polimeraz zincir reaksiyonu (KASP) yöntemi ile bakılmıştır. Çalışılacak olan genler büyük ölçüde genom boyu ilişkilendirme çalışmalarından seçilmiştir. Bu genler:

- *TPMT* (tiyopürin S-metiltransferaz),
- *ITPA* (inozin trifosfat pirofosfataz),
- *MTHFR* (metilen tetrahidrofolat redüktaz),

- *SLCO1B1* (solute carrier organic anion transporter family),
- *IMPDH2* (inozin monofosfat dehidrogenaz),
- *PACSIN2* (Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2),
- *ABCC4* (ATP binding cassette 4) ve
- *PYGL* (glycogen phosphorylase liver) olarak sıralanabilir.

Bu tez çalışmasında,

- ALL hastalarımızın idame tedavisinde kullandıkları 6-MP ve MTX dozları ve protokol ile uyumunu,
- Hastalarda görülen farmakogenetik polimorfizmlerin, 6-MP ve MTX dozlarıyla ilişkisini,
- Farmakogenetik polimorfizmlerin ilaç yan etkileri ile ilişkisini,
- Hastaların idame tedavisinde düşük dozlar kullanmasına karşın tedavi başarısını araştırmak amaçlanmıştır.

Hastaların genetik şemasına özel daha güvenli ve etkili ilaçların kullanılması, tek tip geleneksel tedaviye kıyasla kulağa umut verici gelmektedir. Genetik belirteçler, tek genle geçiş gösteren hastalıklarda büyük başarı sağlamakla beraber, ilaç yanıtının belirlenmesi ve bu testlerin klinikte uygulanabilir olması için henüz uzun bir yol kat edilmesi gerekmektedir (5). Bu yolda atılacak önemli adımlardan biri, toplumun kendi genetik yapısına uygun belirteçlerin saptanması olabilir. Bilindiği kadarıyla, bizim çalışmamız Türkiye’de çocukluk çağı lösemisi idame tedavisinde ilaç ilişkili 15 farklı polimorfizmin, hastaların klinik özellikleri ile değerlendirildiği ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

Tezin bu bölümünde çocuklardaki akut lösemi kliniği, tedavisi; lösemideki farmakogenetik çalışmalar ve tezde çalışılan genetik polimorfizmlere ilişkin literatür özetlenmiştir.

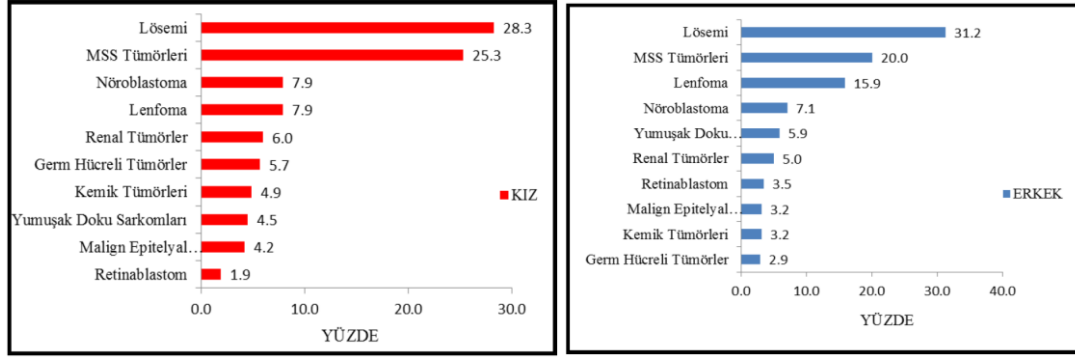
2.1. Akut Lösemi Tanımı ve Epidemiyolojisi

Akut lösemi, kemik iliğinde bulunan lenfoid ve miyeloid öncülü hücrelerin hematopoezin belli bir evresinde farklılaşmasının durması ve klonal olarak çoğalması sonucu, kemik iliğinde fonksiyon bozukluğuna sebep olan malign bir hastalıktır. Söz konusu lösemik hücreler, hem kemik iliğindeki normal hücrelerin yerini alarak, hem de ekstramedüller bölgelere hematojen yolla yayılarak akut lösemilerin klinik tablosunu oluşturur (6).

On beş yaş altı çocuklarda görülen malignitelerin yaklaşık %30'unu akut lösemiler oluşturur (Şekil 2.1). Akut lösemilerin %80'i ALL'dir ve çocukluk çağının en sık kanseridir. Her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yaklaşık 2400 çocuk ALL tanısı almaktadır. Yıllık insidans ABD'de 4/100 000'dir (7). ALL insidansı 2-5 yaşlarında artar ve erkeklerde (erkek/kız:1,3/1) daha sık görülür. Sağlık Bakanlığı verilerine göre Türkiye'de ALL insidansı 0-14 yaş grubunda 41,4/1000 000'tür (8).

2.2. Akut Lösemi Etyopatogenezi

Akut lösemilerin kesin nedeni bilinmemektedir. Lösemi eğilimini arttıran durumlar genetik ve çevresel faktörler olarak özetlenebilir. Genetik faktörler arasında; lösemili kardeşe sahip olma, Down sendromu, Fanconi anemisi, Diamond Blackfan anemisi, Bloom sendromu, Li Fraumeni sendromu, ataksi telenjiyektazi, nörofibromatozis tip 1 ve ağır kombine immün yetmezlik bulunur. Çevresel faktörlere örnek olarak; iyonize radyasyon, bazı ilaçlar (özellikle alkilleyici ajanlar ve epipodofilotoksinler), kimyasal maddeler (benzen ve metabolitleri fenol, hidrokinon, katekol vb.) ve Epstein-Barr virüsü (EBV) verilebilir (9).

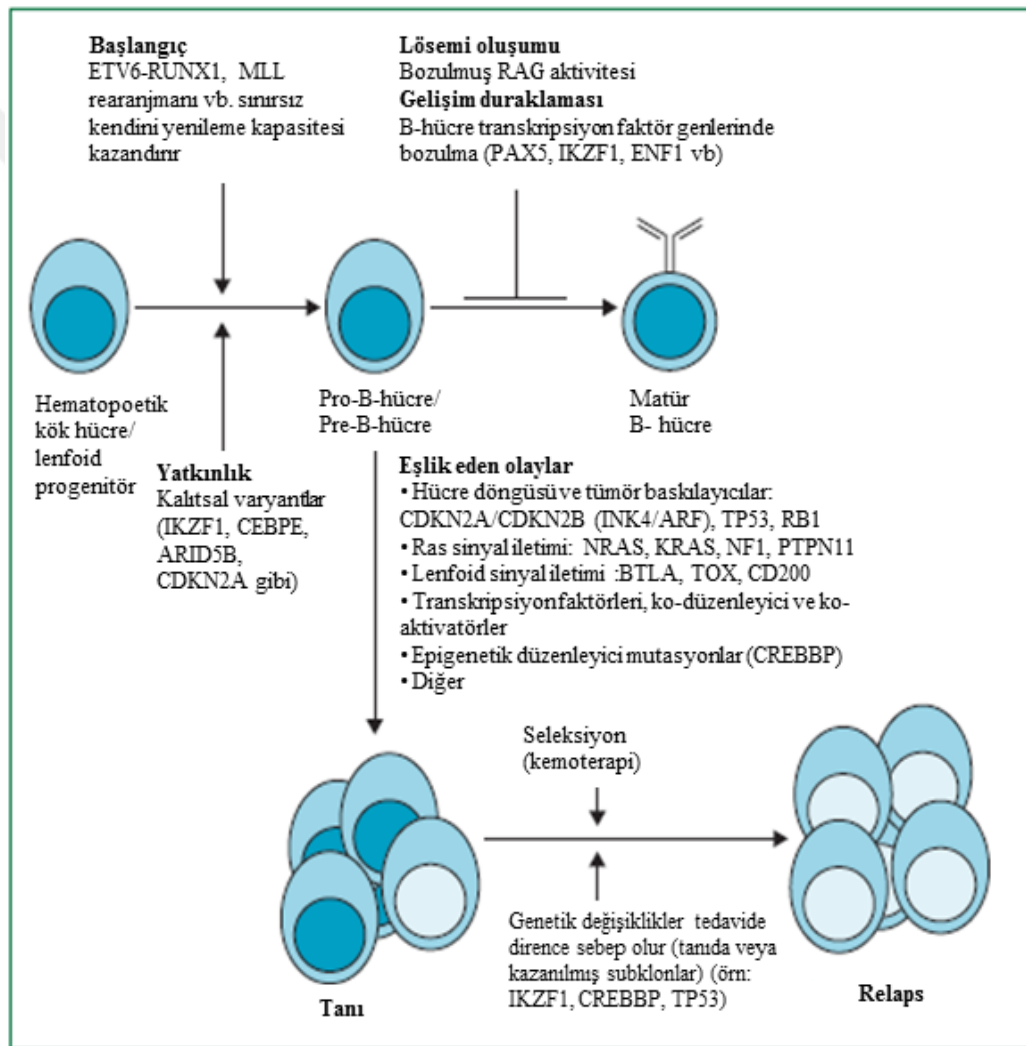


Şekil 2.1. Türkiye’de 0-14 yaş grubundaki kız ve erkek çocuklarında en sık görülen kanserlerin bu grup içindeki dağılımı (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2011)

Günümüzde lösemi oluşumunu, prognozu, relapsı ve tedavi hedefini etkileyen 50’den fazla DNA bölgesinde değişiklik tespit edilmiştir. Genom sekanslama sayesinde lösemideki bu değişikliklerin ayrıntılı olarak tespit edilmesi mümkün hale gelmiştir. ALL, kemik iliğindeki öncül T ve B lenfoid kök hücrelerde meydana gelen spontan mutasyonlar sonucunda, malign transformasyon ve klonal çoğalma ile oluşur. Spontan mutasyon riski klinik lösemiden yıllar önce normal lenfoid dokunun oluşumunda, özellikle immünglobulin ve T-hücre reseptörü gen rearanjmanları sırasında artmaktadır. Patogenezde tek bir mutasyondan çok, ardışık birkaç mutasyon sonrası oluşan hücrelerin çoğalması sorumlu tutulmaktadır. Bu mutasyonlar, tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı ve proto-onkogenlerde fonksiyon kazanımına sebep olur. Apoptoza karşı direnç kazanan tek bir hücrenin farklılaşma yeteneğini kaybederek çoğalması sonucu ölümsüz lösemik klon gelişir (10).

Henüz klinikte rutin genetik testler arasına girmemekle beraber B hücre gelişiminde önemli transkripsiyon faktörlerinden PAX5, IKZF1, EBF1, B-ALL vakalarının üçte ikisinde; INK4/ARF tümör baskılayıcı proteini T-ALL’li hastaların %80’inde değişikliğe uğramıştır. Özellikle *IKZF1* mutasyonunun kötü prognozla ilişkisi gösterilmiştir. Genetik düzenlemelere göre yeni lösemi alt tipleri tanımlanmaktadır. Örneğin B-ALL’lerin %10-12’sinde *BCR-ABL1* negatif olmasına karşın *BCR-ABL1* pozitif hastalığıdaki gen ekspresyonu profiline benzeyen bir alt grup (*BCR-ABL1 like disease*) tanımlanmıştır. Sıklıkla bu grupta *IKZF1* değişikliği saptanmış ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.2) (10).

Lösemiye başlatan hücelere, lösemi kök hüceleri adı verilir. Lösemi kök hüceleri kendini yenileyebilme, multipotansiyel farklılaşma ve immün baskılı durumda tümör oluşumunu başlatma yeteneğine sahiptir. Tümör hüceleri içerisinde az sayıdadır, genelde hücre döngüsünde sessiz evrede olur ve farklı immünfenotipe sahiptir. Konvansiyonel kemoterapi lösemi kök hücelerinizi hızla çoğalmadığı için yok edemeyebilir. İdame tedavisinde kullanılan 6-MP ve MTX ilaçlarının lösemi kök hücelerinizi yok eden anahtar tedavi olduğu düşünülmektedir (11).



Şekil 2.2. B-ALL oluşumu ve relapsın genetik patogenezi (10)

2.3. ALL Tanısı

2.3.1. Klinik Bulgular

Aileden alınan ayrıntılı anamnez ve dikkatle değerlendirilen fizik muayene lösemi tanısında önemli yer tutar. Semptomların süresi günler veya ayları bulabilir. Klinik bulgular kemik iliği infiltrasyonu, lenfoid ve ekstramedüller sistemin tutulması sonucu ortaya çıkar. Kemik iliğinde üç serinin etkilenmesine bağlı olarak anemi, nötropeni ve trombositopeni görülür. Solukluk, çabuk yorulma, taşikardi ve dispne anemiye bağlı görülür. Ateşin nedeni nötropenidir. Fırsatçı bakteriler, virüs ve mantarlar da dahil olmak üzere enfeksiyon gelişimine yatkınlık artmıştır. Mümkün olan en kısa sürede gerekli kültürler alınmalı ve uygun antibiyoterapi düzenlenmelidir. Trombositopeni, peteşi, purpura, çabuk morarma ve mukozada kanamaya neden olur. %1-2 olgu pansitopeni ile başvurur. Yanlışlıkla aplastik anemi tanısı alabilir (12).

Lösemi hücrelerinin kemik iliği dışında en sık tuttuğu organlar lenf nodları, karaciğer, dalak, testisler, santral sinir sistemi (SSS) ve böbreklerdir. Lösemik blastların lenfoid sistem yayılımı sonucu lenfadenopati (LAP), hepatomegali ve splenomegali saptanır. Özellikle T hücreli lösemide mediastinal tutulum sıktır; solunum sıkıntısı ve superior vena kava sendromuna neden olabilir (12).

Ekstramedüller sistem bulguları arasında %5'ten az olguda baş ağrısı, kusma, papilla ödemi, hipotalamik sendrom (polifaji, davranış değişikliği), santral diabetes insipidus, fokal nörolojik bulgular, kafa çiftleri felci bulunması SSS tutulumu ile ilişkilidir. Beyin omurilik sıvısının (BOS) bulgularına göre SSS tutulumu belirlenir. Olguların %25'inde kemik ve eklem tutulumu görülür. Çocuklar ekstremitte ağrısı ve yürüyememe şikayetleri ile başvurup artrit tanısı ile izlenebilir. Tanıda erkeklerin %1-2'sinde testiste ağrısız şişlik saptanır. Testis biyopsisi yapılan ALL'li olguların %20'sinde testis tutulumu gösterilmiştir (Tablo 2.1) (12).

Akut lösemi ayırıcı tanısında lökomoid reaksiyon, enfeksiyonlar, nöroblastom gibi kemik iliğini tutan çocukluk çağı maligniteleri, juvenil idiyopatik artrit, miyeloproliferatif hastalıklar, idiyopatik trombositopenik purpura ve aplastik anemi gibi diğer hematolojik hastalıklar yer alır (13).

2.3.2. Laboratuvar Bulguları

Hastada tanısal olarak yapılacak ilk incelemeler, tam kan sayımı ve periferik kan yaymasıdır. Olguların çoğunda anemi ve trombositopeni gözlenir. Lökosit sayısı artmış, azalmış veya normal sınırlarda saptanabilir.

Tablo 2.1. Çocukluk çağı ALL hastalarının tanı anında görülen klinik ve laboratuvar özellikleri (14)

Özellikler	Görülme sıklığı (%)
Klinik Bulgular	
Ateş	61
Halsizlik	50
Solukluk	40
Kanama	48
Kemik ağrısı	23
Lenfadenopati	50
Splenomegali	63
Hepatosplenomegali	68
Mediastende kitle	5-10
SSS tutulumu	5
Testis tutulumu	2
Laboratuvar bulguları	
Lökosit sayısı (/mm ³)	
<10,000	53
10,000-49,000	30
>50,000	17
Hemoglobin (g/dL)	
<7	43
7-11	45
>11	12
Trombosit sayısı (/mm ³)	
<20,000	28
20,000-99,000	47
>100,000	25

Periferik kan yayması, blastların görülmesi ve hücre morfolojisinin belirlenmesi için çok değerlidir. Her lösemi düşünülen olguda kemik iliği aspirasyonu yapılmalıdır. Kemik iliğinde %25'ten fazla lenfoblast görülmesi ile ALL tanısı konulur. Hücre tipini belirlemek için ayrıca kemik iliğinden histokimyasal boyama, immünofenotipleme ve genetik inceleme yapılır. Tanıda BOS'da hücre varlığı SSS tutulumu açısından değerlendirilmelidir. İlk BOS örneği dikkatle alınmalı, travmatik işlemlerden SSS relapsını arttırabileceği için kaçınılmalıdır. Mediasten ve kemik tutulumu için direk akciğer ve kemik grafileri, kan biyokimyası, koagülasyon parametreleri, tedavi öncesi durumun belirlenmesi için kardiyak fonksiyonlar, enfeksiyon profili ve immünolojik tarama diğer tanı anında yapılması gereken incelemelerdir (14).

2.4. ALL Sınıflandırması

Lösemide sınıflama, hematopoezin hangi evresinde malign dönüşümün gerçekleştiğini belirlemeye yöneliktir. Blastların morfolojik, histokimyasal, immünofenotipik ve moleküler genetik özelliklerine dayanarak lösemi alt grupları belirlenir. Çocuklarda lösemilerin %97'sini akut lösemiler, bu vakaların %75-80'ini ise ALL oluşturur.

2.4.1. Morfolojik Sınıflama

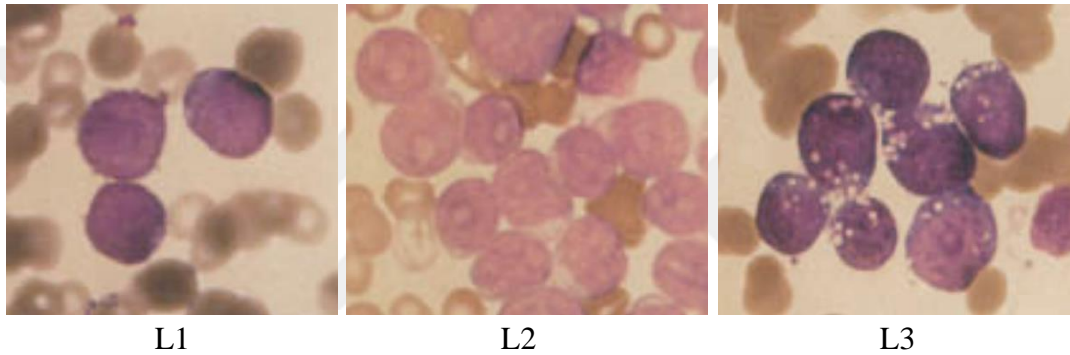
Değişik sınıflamalardan en sık olarak FAB (French-American-British) skalası kullanılır. ALL'ler bu sınıflamaya göre 3'e ayrılır (Şekil 2.3) (13):

- **FAB L1 tipi:** Çocukluk çağı ALL'lerinin %85'ini oluşturur. Blastlar küçük, birbirine benzer ve dar sitoplazmaya sahiptir. Nükleusun sitoplazmaya oranı yüksektir. Çoğunda nükleolus yoktur. Vakuol içermez.

- **FAB L2 tipi:** ALL'lerin %14'ünü oluşturur. Blastlar farklı büyüklükte, daha geniş sitoplazmalıdır. Nükleolusları vardır. Vakuolleri olabilir. AML'den ayırt etmek zor olabilir.

• **FAB L3 tipi:** ALL'lerin %1'ini oluşturur. Büyük boyutlu, koyu mor bazofilik sitoplazmalı, bol vakuollü ve nükleoluslu hücrelerdir. Burkitt lenfomanın lösemik şeklidir.

Lösemi tanısı konulduktan sonra lenfoid-miyeloid blast ayrımı için histokimyasal boyalar ve akım sitometri çalışmaları yapılır. ALL'de lösemik hücreler periodic acid Schiff (PAS) ve terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ile boyanırken; AML'de miyeloperoksidaz (MPO), non-spesifik esteraz ve Sudan black ile boyanma tespit edilir (13).



Şekil 2.3. Akut lenfoblastik lösemide FAB sınıflaması (13)

2.4.2. İmmünolojik Sınıflama

İmmünofenotipleme, lösemik hücrenin gelişiminin hangi aşamasında durduğunu anlamaya yarayan testtir. Akım sitometrisi ile yapılır. ALL, lenfoblastların hücre yüzeyinde ve sitoplazmasında bulunan farklılaşma safhasına özgü antijenlere (CD: *Cluster of Differentiation*) göre dört ana gruba ayrılır (Tablo 2.2). Bu alt grupların birbirinden ayırt edici klinik ve prognostik özellikleri vardır (13):

I. Öncül B hücreli ALL: Çocukluk çağı ALL hastalarının %80'ini oluşturur. B hücre ilişkili antijenlere özgü monoklonal antikorlar ile reaksiyon verir. Matür B hücreli ALL'den yüzey immünglobulinin (Ig) olmaması ile ayırt edilir. Bu grubun çoğunda *common* ALL antijen (CALLA) olarak da bilinen CD10 mevcuttur. %90'dan fazla vakada Ig gen rearanjmanları bulunur. Lösemiye özgü immünglobulin gen rearanjmanlarının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tespiti, mikroskopla fark edilemeyen rezidü lösemi hücrelerinin fark edilmesini sağlar. Yüzey belirteçleri

ve hücre içi Ig'lerine göre öncül B hücreli ALL üç alt gruba ayrılır: pro-B ALL, erken pre-B ALL ve pre-B ALL.

- Pro-B ALL: Çok immatür B hücrelerden oluşur, CD 10 negatiftir. Sıklıkla infant ALL'sinde tespit edilir ve MLL geninde (kromozom 11q23) bozuklukla ilişkilidir.
- Erken pre-B ALL: Pro-B ALL'ye göre daha olgunlaşmış hücrelerden oluşur. CD 10 pozitifdir.
- Pre-B ALL: Sitoplazmik Ig içermesiyle diğer ikisinden ayırt edilir; ancak yüzey Ig'i bulunduracak kadar olgunlaşmamıştır. %25 vakada t(1;19) translokasyonu bulunur.

II. Olgun B hücreli ALL: Hastaların %1-2'sini oluşturur. Yüzey Ig'e sahiptir. Kromozom translokasyonlarından t(8;14), t(2;8) veya t(8;22)'ye rastlanır. Burkitt lenfomadan ayrımı güçtür ve lenfoma tedavisine daha iyi yanıt verir.

III. T hücreli ALL: Vakaların %10-15'ini oluşturur. Daha ileri yaşta görülür. Başvuruda beyaz küre sayısı yüksektir. Ekstramedüller hastalık ve sık relaps ile ilişkilidir.

IV. Miyeloid antijen koekspresyonu: %20 vakada lösemi hücreleri, lenfoid ve miyeloid yüzey antijenlerini aynı anda bulundurur. İnfant ALL, pro-B hücre ve bazı kromozom anomalileri ile ilişkilidir. Yapılan son çalışmalar ile prognoza ilişkin önemi gösterilememiştir.

Tablo 2.2. ALL'de immünofenotip sınıflandırma (13)

ALL alt tipi	Sıklık (%)	Yüzey Belirteci (CD)
Öncül B hücre	70	10, 19, 20, 22, 24
Öncül B hücre (miyeloid varyant +)	10	Aynı zamanda 11, 13, 14, 15, 33, 34, 31, 42 eksprese eder
Olgun B hücre	2-5	10±, 19, 20, 22, 25, yüzey Ig
T hücre	16	2, 3, 4, 5, 7, 8

2.4.3. Sitogenetik Sınıflama

Hastalığın seyri açısından önemli veriler elde edilen bir sınıflamadır. ALL hastalarının %90'ında karyotipte bozukluk bildirilmiştir. Kromozomdaki bozukluk sayısal veya yapısal olabilir (10):

- **Kromozom sayısal bozuklukları:** Sitogenetik çalışma veya akım sitometri ile tespit edilir. Akım sitometri ile ölçülen normal hücre ve blast içindeki DNA miktarının birbirine oranlanmasıyla DNA indeksi hesaplanır. Bu oran $>1,16$ ise hiperdiploidi, <1 ise hipodiploidi denir.

- **Kromozom yapısal bozuklukları:** Karyotip analizi ile tespit edilemeyen bozukluklar floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve PZR gibi daha duyarlı yöntemler ile saptanabilir. ALL'lerin %75'inde translokasyon saptanır. Translokasyon genellikle, protein kinaz veya transkripsiyon faktörlerinin aktifleşmesine neden olur.

- **İyi prognoz belirteçleri:** Yüksek hiperdiploidi (51-65 kromozom), *TEL-AML (ETV6-RUNX1)* füzyonudur. Hiperdiploidi olan hastalarda trizomi 4,10 ve 17 olması hastalık seyrini daha da olumlu etkilemektedir. *TEL-AML* füzyonu pre-B ALL vakalarının %25'inde saptanır ve füzyon protein, transkripsiyonu baskılar.

- **Kötü prognoz belirteçleri:** Hipodiploidi (<45 kromozom), *BCR-ABL* füzyonu ve *MLL* gen yeni oluşumudur. *BCR-ABL* füzyonu olguların %3-5'inde bulunur. ALL'de oluşan ürün hücreyi apoptoza dirençli hale getirir. Büyük yaş, yüksek lökosit sayısı ve SSS tutulumu ile birlikte. Bu hastalarda tirozin kinaz inhibitörleri, yoğun kemoterapi ve ilk remisyonda hematopoetik kök hücre nakli ile daha iyi sonuçlar elde edilmektedir. *MLL* gen yeni oluşumu süt çocuğu ALL'lerinin %80'ini oluşturur ve yoğun tedaviye rağmen prognoz kötüdür.

Bahsedilen kromozom anomalileri belli immünofenotiple birliktelik gösterir (Tablo 2.3).

2.5. ALL'de Prognoza Etki Eden Faktörler

Tanı anında hastalık seyrine etki eden risk faktörlerinin belirlenmesi, modern tedavi protokollerinde tedavi başarısını arttıran temel unsurdur. Hastalar prognozla

ilişkili belirteçlere göre gruplandırılır ve buna uygun yoğunlukta kemoterapi verilir. Hastalık gidişine etki eden faktörler; tanı anında hastanın klinik özellikleri, hastalığa ilişkin özellikler ve tedaviye ilk cevap olarak özetlenebilir (15):

- **Yaş:** <1 ve >10 yaş olan hastalarda hastalık seyri kötüdür. Bir yaş altı hastalarda yoğun tedaviye karşın relaps riski yüksektir.
- **Lökosit sayısı:** Başlangıç lökosit sayısı >50 000/mm³ ise daha kötü seyirlidir.
- **İmmünotip:** T-ALL’de prognoz pre B-ALL’ye göre olumsuzdur. Olgun B hücreli ALL, yaygın Burkitt lenfoma gibi davranmaktadır.
- **Kromozom sayısı ve DNA indeksi:** Hiperdiploidi (50 veya daha fazla kromozom) iyi, hipodiploidi (46’dan daha az kromozom) kötü prognoz belirteçidir. DNA indeksi >1,16 ise prognoz daha iyidir.

Tablo 2.3. Çocukluk çağı ALL’de sık görülen kromozom bozuklukları (9)

ALL alt tipi	Kromozom anomalisi	Genetik değişiklik	Prognoz	İnsidans
B-ALL	Trizomi 4,10 ve 17	-	İyi	%25
B-ALL	t(12;21)	ETV6-RUNX1 (TEL-AML)	İyi	%20-25
B-ALL	t(1;19)	E2A-PBX	Yok	%5-6
B-ALL	t(4;11)	MLL-AF4	Kötü	%2
B-ALL	t(9;22)	BCR-ABL	Kötü	%3
Matür B hücreli lösemi	t(8;14)	IGH-MYC	Yok	%1-2
B-ALL	Hiperdiploidi	-	İyi	%20-25
B-ALL	Hipodiploidi	-	Kötü	%1
T-ALL	t(10;14)	TLX/HOX11	İyi	%5-10
İnfant ALL	11q23	MLL gen yeni oluşumu	Kötü	%2-10

- **Sitogenetik:** Prognoza etki eden sitogenetik değişiklikler ETV6-RUNX1; trizomi 4, 10, 17, BCR-ABL; hipodiploidi, iAMP21 amplifikasyonu ve MLL translokasyonu olarak belirlenmiştir. MLL gen yeni oluşumunda, FLT3 adlı tirozin kinaz ekspresyonu artmakta ve bu nedenle FLT3 inhibitörleri (lestaurtinib) tedavide kullanılabilir.

- **SSS hastalığı:** Tanı sırasında SSS tutulumu olması kötü prognozla ilişkilidir.

- **Tedaviye erken yanıt:** Prognoza etki eden en önemli faktördür. İndüksiyon tedavisinin sonunda kemik iliğinde <%5 blast saptanırsa remisyon olarak kabul edilir; ancak bu hastaların pek çoğunda az miktarda lösemi blastları kemik iliğinde bulunmaktadır. Morfolojik olarak tespit edilemese de, akım sitometride 10^{-4} ve PZR yöntemi ile 10^{-4-6} oranında blastlar saptanabilir. Buna “**minimal rezidüel hastalık**” (MRH) denir. İndüksiyon tedavisi sonrasında 28. gün blast oranının >%0,1 (1000 çekirdekli hücre arasında 1’den fazla lösemi hücresi) olması erken relaps ile kuvvetle ilişkilidir. MRH tespit edilmeyen olguların prognozu ise %90’ın üstündedir. MRH bakılmayan merkezlerde indüksiyonun 15 ve 29. gününde yapılan kemik iliği incelemesindeki blast sayısı risk grubunu etkilemektedir.

Ayrıca erkeklerde ve bazı etnik gruplarda hastalık daha olumsuz seyretmektedir. Farklı çalışma gruplarının sınıflandırmaları değişken olmakla beraber burada bölümümüzde uygulanmakta olan COG (Children’s Oncology Group)’un protokollerindeki risk sınıflaması esas alınmıştır (16). İndüksiyon sonrası kemik iliğinde morfolojik değerlendirme, SSS tutulumu, testis tutulumu, önceden steroid verilmesi, sitogenetik özellikler ve MRH’a göre hastalar düşük, standart, yüksek ve çok yüksek risk olmak üzere dört gruba ayrılır (Tablo 2.4). Kemik iliği incelemesine göre:

- M1: <%5 lenfoblast
- M2: %5-25 lenfoblast
- M3: >%25 lenfoblastı tanımlar.

Buna göre 15. gün kemik iliği M1 veya 29. gün kemik iliğinde MRH negatif olan hastalar hızlı erken yanıt veren (RER: rapid early responder) ve M2-M3 kemik

iliği veya MRH pozitif olanlar yavaş erken yanıt veren (SER: slow early responders) olarak iki kola ayrılır ve protokolde farklı yoğunlukta tedaviler uygulanır.

Tablo 2.4. ALL hastalarında risk sınıflaması (16)

Risk grubu	Özellikler	Yüzde	5 yıllık olaysız sağ-kalm
Düşük	Tümü varsa: 1. NCI standart risk* 2. Düşük riskli sitogenetik: Trizomi 4 ve 10 veya <i>ETV-RUNX1</i> veya Hiperdiploidi 3. Tedaviye hızlı yanıt**	%15	>%95
Standart	İkisinden birisi varsa: 1. NCI standart risk ve Tedaviye hızlı yanıt 2. NCI standart risk ve Düşük riskli sitogenetik ve Tedaviye yavaş yanıt***	%36	%90-95
Yüksek	Herhangi birisi varsa: 1. NCI yüksek risk^ ve Tedaviye hızlı yanıt 2. NCI standart risk ve Tedaviye yavaş yanıt 3. SSS tutulumu 4. Testis tutulumu	%25	%88-90
Çok yüksek	Herhangi birisi varsa: 1. 29. günde MRH 2. İndüksiyon başarısızlığı 3. <i>MLL</i> rearanjmanı veya <i>iAMP21</i> amplifikasyonu 4. Yaş <1 (veya COG protokolü ile tedavi olmuşsa >13)	%24	<%80
Özel gruplar	T hücreli ALL		%66-80
	Philadelphia kromozom t(9;22)		%70

NCI: National Cancer Institute, *MLL*: mixed lineage leukemia gene, *iAMP21*: intrachromosomal amplification of chromosome 21

*NCI standart risk: Lökosit <50 000/mm³ ve yaş >1, <10

**Tedaviye hızlı yanıt: MRH 8 ve 29. gün negatif

***Tedaviye yavaş yanıt: MRH 8. günde pozitif, 29. günde negatif

^NCI yüksek risk: Lökosit >50 000/mm³ ve yaş ≥10 (COG protokolünde 13 yaş)

2.6. ALL Tedavisi

ALL'de en önemli prognostik faktör tedavidir. Lösemi tedavisi; standart araştırma protokollerinde yer alan indüksiyon, konsolidasyon ve idamedeki çoklu kemoterapi ajanları, SSS profilaksisi ve destek tedavilerinden oluşur. Tedavi rejimleri risk grubuna göre belirlenmekte ve genel olarak 2-3 yıl sürmektedir (10).

Bu alandaki pek çok ilaç 1970'ten önce geliştirilmiştir. Ancak dozları ve kombinasyon kemoterapi halinde verilme şeması; lösemi hücresinin biyolojik özelliklerine, tedavi yanıtına, hastaların farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerine göre iyileştirilmektedir. SSS profilaksisi ile relaps önlenirken, hematopoetik kök hücre nakli çok yüksek riskli hastalar için bir seçenek haline gelmiştir (10). Bu sayede ALL hastalarında beş yıllık sağ-kalım oranı 1980'lerden beri dramatik olarak artmış ve %90'ı bulmaktadır (7). ALL tedavisinde amaç klinik ve hematolojik remisyona ulaşmak, remisyona devamlı kılmak, hastalık ve tedavi komplikasyonları ile baş etmektir.

İndüksiyonda amaç kemik iliğini remisyona sokmaktır. Remisyona; klinik ve fizik muayene bulgularının normale dönmesi, hematolojik olarak normal bir kan tablosuna sahip olunması ve periferik kan yaymasında blast olmaması demektir. Kemik iliğinde normal erken öncül hücreler varken, blast sayısı <%5 olmalıdır. İndüksiyon tedavisi haftalık vinkristin, kortikosteroid ve asparaginazdan oluşan dört haftalık süreci kapsar. Yüksek riskli hastalarda antrasiklin türevi bir ilaç bu üçlü tedaviye eklenebilir. *BCR-ABL1* pozitif hastalık, kötü seyirli olmakla beraber tirozin kinaz inhibitörlerinden (imatinib, dasatinib) fayda görmektedir. Bu yaklaşımla hastaların yaklaşık %90'ı tamamen remisyona girer. İndüksiyon tedavisi sırasında kemik iliği değerlendirilerek tedaviye geç ve hızlı yanıt veren hastalar belirlenir. Lenfoblastların kemik iliğinden erken temizlenmesi ve 15. günde negatif MRH, en olumlu faktörlerdir (13).

Normalde hastalık başlangıcında SSS tutulumu nadirdir. Hastalarda geç dönem SSS relapsını önlemek için sistemik tedaviye ek olarak tekrarlayan dozlarda intratekal kemoterapi verilmektedir. Böylece geç dönem SSS relaps riski %80'den, <%5'e düşürülür. Kranial radyoterapi, SSS lösemisini önlemek için etkili olmakla

beraber, ciddi toksisite nedeniyle özellikle düşük riskli hastalarda yerini intratekal kemoterapiye bırakmıştır (13).

İndüksiyon tedavisiyle remisyon sağlandıktan sonra, 4-5 ay kadar süren konsolidasyon veya intensifikasyon dönemi gelir. İndüksiyon sonrası tedavideki amaç, lösemi hücrelerinin tekrar ortaya çıkışını önlemek, rezidü kanser hücrelerini azaltmak ve ilaç direncini önlemektir. Sitarabin, metotreksat, antrasiklinler, alkilleyici ajanlar ve epipodofilotoksinler bu dönemde kullanılır. Yüksek riskli hastalara yaşama şansını arttırmak için dört-altı haftalık, indüksiyon tedavisindeki ilaçlara benzer, geç intensifikasyon tedavisi verilir. İndüksiyon ve geç intensifikasyon tedavisi arasında daha az yoğun tedaviler tercih edilir (13).

Konsolidasyon sonrasında, günlük oral 6-MP, haftalık MTX ve periyodik vinkristin, kortikosteroid ve intratekal tedaviden oluşan idame tedavisi gelir. Lösemide tedavi başarısı kızlarda 2, erkeklerde 3 yıl kadar süren yeterli idame tedavisi ile remisyonun sürdürülmesine bağlıdır. İlaç ilişkili toksisitenin azaltılması ile daha başarılı sonuçlar alınabilir. Genom teknolojisindeki gelişmeler sayesinde hastaların ilaç yanıtlarındaki farklılıklar keşfedilmekte ve kişiye özel tedaviler hedeflenmektedir (10).

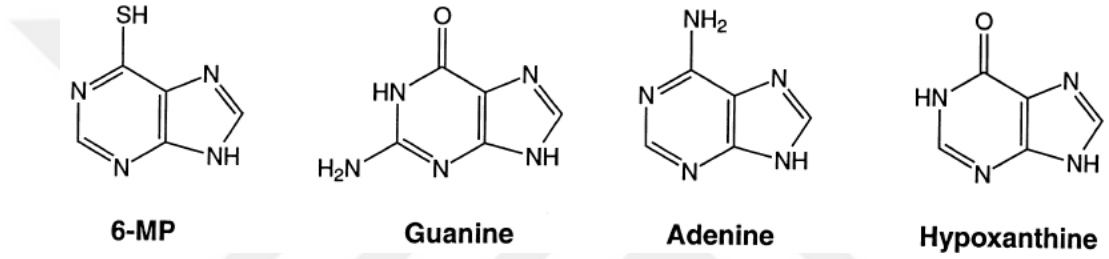
Lösemi, her ne kadar en iyi tedavi edilen çocukluk çağı kanseri olsa da hastaların %15-20'sinde nüks etmektedir. Nüks en sık kemik iliğinde daha nadiren SSS, testis ve diğer organlarda görülebilir. Erken relaps olanlarda prognoz daha kötüdür (13).

2.7. ALL İdame Tedavisinde Kullanılan 6-MP ve MTX İlaçları ve Metabolizması

Folat analogu MTX ve tiyopürin analogu 6-MP yaklaşık 50 yıldır kanser ilacı olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar ALL hastalarının günlük 6-MP ve haftalık MTX sayesinde daha uzun süre remisyonda kaldığını ve sağ kalımı uzattığını göstermiştir. İki ilacın birlikte kullanılması pek çok deneysel ve klinik çalışmada tanımlanan sinerjistik etkiye dayanmaktadır (17).

2.7.1. 6-MP Metabolizması ve Mekanizması

Tiyopürinler; ALL, otoimmün hastalıklar (inflamatuvar bağırsak hastalığı, romatoid artrit gibi) ve organ nakli alıcılarında sık kullanılan pürin antimetabolitleridir. Bu grupta 6-MP, tiyoguanin ve azatiyopürin (AZA) yer alır. 6-MP, yapısal olarak endojen pürinler olan adenin, guanin ve hipoksantine benzeyen bir moleküldür (Şekil 2.4). 6-MP vücuda alındıktan sonra bağırsaklardan hızla emilir ve vücutta yarılanma ömrü 1-2 saat kadardır. Besinlerle verildiğinde emilimi azaldığı için, akşamları aç karnına alınması önerilir.



Şekil 2.4. 6-MP kimyasal yapısı (17)

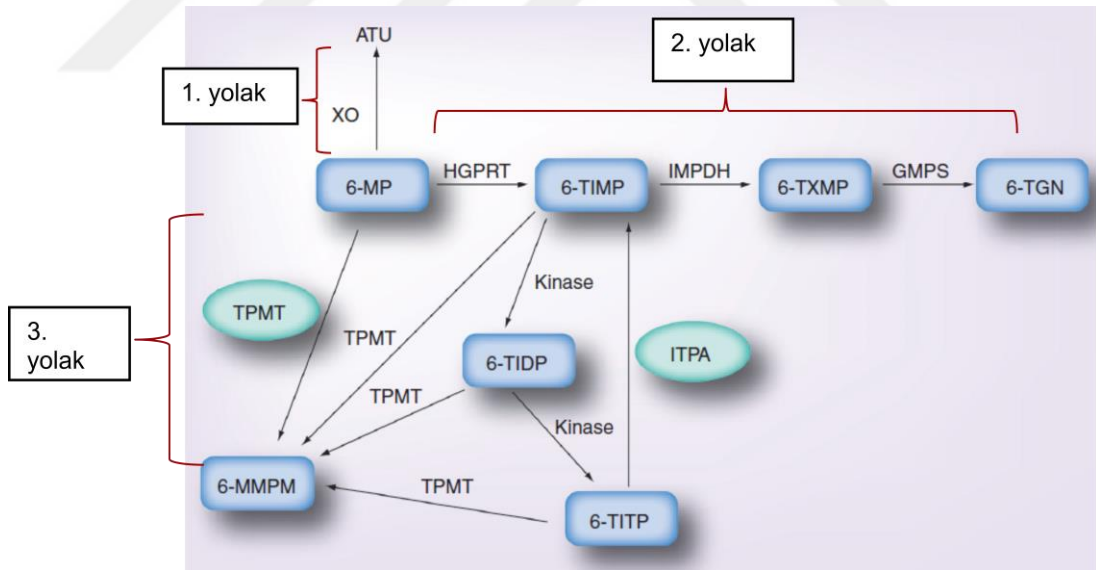
Metabolizmasında üç tane temel yol yer alır (18) (Şekil 2.5):

- **Birinci yol:** İlk geçiş metabolizması ile 6-MP'nin büyük bir kısmı ksantin oksidaz enzimi ile inaktif bir molekül olan 6-tiyourik aside (ATU) dönüşür. Tiyourik asit idrarla atılır. Ksantin oksidaz, allopurinol tarafından inhibe edilir ve bu ilacın kullanımında 6-MP biyoyararlanımı artar.

- **İkinci yol:** Anabolik bir yoldur. Bir ilaç öncülü olan 6-MP; çok basamaklı enzim reaksiyonlarından sonra aktif molekül olan 6-tiyoguanine (6-TGN) dönüşür. Bu işlem sırasında, hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) enzimi, 6-MP'nin 6-tiyoinozin monofosfata (6-TIMP) dönüşmesini sağlar. İnozin monofosfat dehidrogenaz (IMPDH) enziminin de yer aldığı birkaç basamaktan sonra 6-TGN oluşur. 6-MP esas mekanizması olarak, çekirdekli hücrelerde 6-TGN, DNA ve RNA ile birleşir. Böylece replikasyon sonrası onarım sistemleri bozularak DNA kırıkları ve apoptoz meydana gelir.

- **Üçüncü yol:** 6-MP'i tiyometilasyon ile inaktive eden yoldur. TPMT enzimi tarafından katalizlenir ve 6-TGN oluşumunu azaltır. Bu yolla oluşan metilli 6-MP metabolitleri pürin *de novo* sentezini engeller. Lenfoblastlarda pürin kurtarma yolu düşük seviyede olup pürin *de novo* sentezine daha çok bağımlı oldukları için bu yolak önemlidir. İnozin trifosfat pirofosfataz (ITPA) enzimi ile toksik metilli metabolitlerin bir kısmı inaktive edilir.

Birkaç hafta oral 6-MP tedavisinden sonra eritrositlerde dengeli 6-TGN seviyesi elde edilir. Bu seviye hastanın ilaç uyumunu ve TPMT aktivitesini yansıtmakta ve hastalar arasında değişmektedir. TPMT aktivitesi düşük olan kişiler tiyopürinleri katabolize edemezler ve TGN artarak ciddi miyelotoksisiteye neden olur. Metilli metabolitler ise hepatotoksisiteye neden olur (18). Merkaptopürine bağlı görülen diğer yan etkiler; erken dönemde kusma, ishal, allerjik döküntüdür. Birkaç hafta içerisinde mukozit, hepatit ve kemik iliği baskılanması gelişebilir. Geç dönemde pulmoner fibroz, oligospermi ve sekonder maligniteler görülebilir.



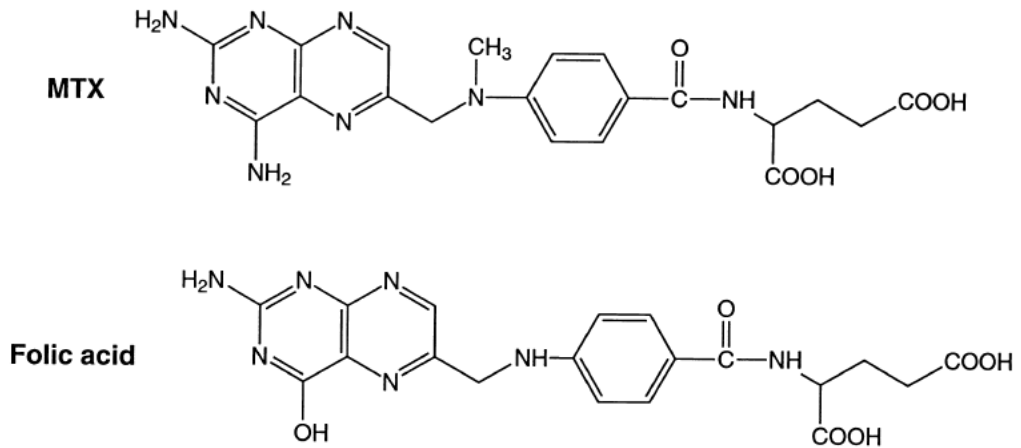
Şekil 2.5. 6-MP hücre içindeki metabolizması (4)

(6-MMPM: 6-metilmerkaptopürin metabolitleri, 6-TGN: 6-tiyogüanin nükleotit, 6-TIDP: 6-tiyoinozin difosfat, 6-TIMP: 6-tiyoinozin monofosfat, 6-TITP: 6-tiyoinozin trifosfat, 6-TXMP: 6-tiyoksantin monofosfat, ATU: tiyürik asit, GMPS: Guanozin monofosfat sentataz, HGPRT: hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz, IMPDH: İnozin monofosfat dehidrogenaz, ITPA: İnozin trifosfat pirofosfataz, TPMT: Tiyopürin-S-metiltransferaz, XO: ksantin oksidaz)

2.7.2. MTX Metabolizması ve Mekanizması

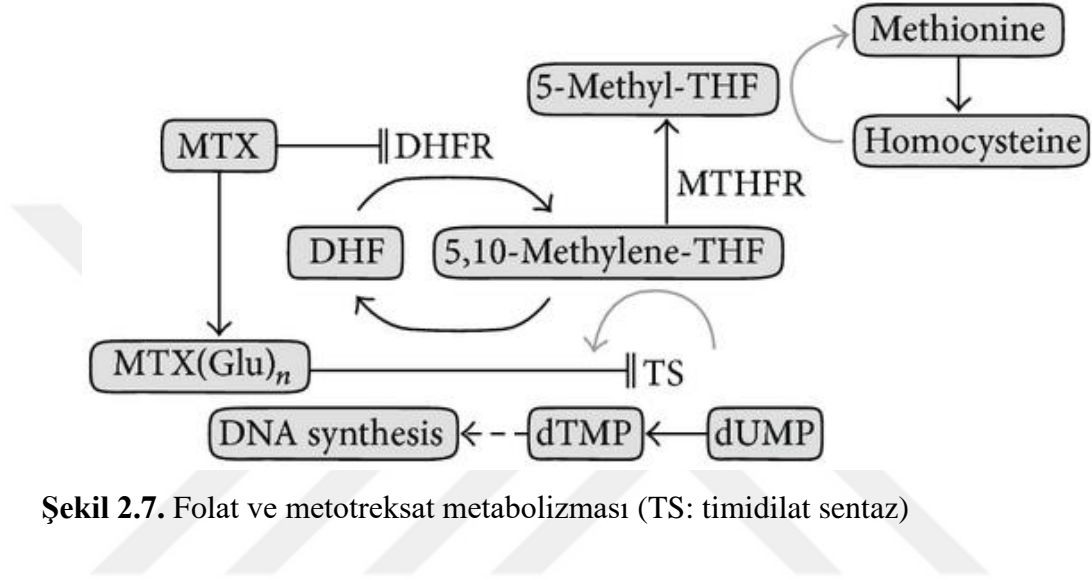
MTX, 6-MP gibi bir antimetabolittir. Kimyasal olarak folik aside çok benzer (Şekil 2.6). Vücutta yarılanma ömrü düşük doz tedavide 3-10 saat, yüksek doz için 8-15 saattir. Hücre içine SLCO1B1 adlı taşıyıcı protein vasıtasıyla girer. MTX maksimum sitotoksik etkisini, poliglutamasyon ile aktif moleküle çevrilerek gösterir. Folik asidin aktif formu olan tetrahidrofolat (THF), dihidrofolat redüktaz enziminin dihidrofolat (DHF) ile reaksiyonu sonucu oluşur. Tetrahidrofolat, DNA ve RNA nükleotitlerin sentezi için gerekli tek karbonlu moleküllerin transferinde yer alır. Dihidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin metotreksat tarafından inhibisyonu, THF'ın azalmasına yol açarak özellikle hızlı çoğalan hücreler üzerine sitotoksik etki gösterir (Şekil 2.7) (19).

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) folat metabolizmasında yer alan önemli bir enzimdir. THF'ın, folat molekülünün dolaşımında bulunan formu olan metil-THF'a redüksiyonunu sağlar. Metil-THF aynı zamanda, homosisteinden metiyonin oluşumunda karbon vericisidir. S-adenozil metiyonin (S-AdoMet), metiyoninden sentezlenir ve vücutta TPMT'nin de yer aldığı pek çok yolda metil vericisi olarak görev yapar. MTX, folat metabolizmasını bozarak MTHFR enzimini de inhibe eder (20).



Şekil 2.6. MTX kimyasal yapısı (17)

Düşük doz oral MTX biyoyararlanımı $>90\%$ 'dir; ancak $>40\text{mg}/\text{m}^2$ dozlarda biyoyararlanım önemli ölçüde azalır. Konsolidasyon tedavisinde verilen yüksek doz MTX, DHFR enzimini inhibe ederken, idame tedavisindeki haftalık düşük doz oral MTX, kemik iliğindeki eritroid hücre öncüllerine bağlanır ve miyelotoksisite ile ilişkilidir. MTX esas olarak böbreklerden atılır (11).



Şekil 2.7. Folat ve metotreksat metabolizması (TS: timidilat sentaz)

Metotreksata bağlı yan etkilere bakıldığında erken dönemde bulantı, kusma, transaminaz yüksekliği ve allerjik reaksiyonlar görülür. İlacı aldıktan 2-3 hafta sonra kemik iliği baskılanması, gingivitis, stomatit, alopesi, nefrotoksisite, hepatotoksisite ve nörotoksisite gelişebilir. Geç dönem etkileri arasında öğrenme güçlüğü, lökoensefalopati, pulmoner fibroz, hepatik fibroz, osteonekroz, perikardit ve tırnaklarda hiperpigmentasyon yer alır (11).

2.8. İdame Tedavisinde Kullanılan 6-MP ve MTX Dozlarının Ayarlanması ve Önemi

İlaç dozları ile ilgili uluslararası ortak bir karara varılamamıştır. Protokollerde yer alan ilaç dozları kanıttan çok, geleneksel dozları yansıtmaktadır. Avrupa'nın pek çok ülkesinde 6-MP için önerilen başlangıç dozu $50\text{ mg}/\text{m}^2/\text{gün}$ iken; İngiltere, kuzey ülkeleri ve ABD'de $75\text{ mg}/\text{m}^2/\text{gün}$ kullanılmaktadır (21). Ağızdan verilen MTX için başlama dozu $20\text{-}40\text{ mg}/\text{m}^2/\text{hafta}$ olarak değişmektedir. Bazen ilaca

uyumu arttırmak için parenteral yol tercih edilse de bu yolun daha etkili olduğuna dair veri yoktur ve MTX'a bağlı nörotoksisiteyi arttırmaktadır. İdame tedavisi sırasında hastanın lökosit sayısı 2000-3000/mm³ olacak şekilde ağızdan verilen günlük 6-MP ve haftalık MTX dozları ayarlanır. Kemoterapi sırasında karaciğer fonksiyonlarında bozulma izlenebilir. Ancak bilirübin düzeyi 5g/dL üzerine çıkmadığı sürece tedaviye devam edilir (12).

6-MP/MTX dozlarının önemi ilk kez 1960 yılında, idame tedavisini 50 mg/m²/gün 6-MP ve 20 mg/m²/hafta MTX alan çocuklar ile yarı dozda alan çocuklar randomize edildiğinde, tam doz alanların daha uzun süre remisyonunda kalmaları ile gösterilmiştir. 6-MP/MTX ilaçlarının bireyler arasında farmakokinetik özellikleri farklı olduğu için metrekare başına aynı dozu alsalar bile ilaç konsantrasyonu dokuda değişmektedir. Bu nedenle, ALL protokollerinde belirtilen dozların başlangıç dozu olarak kullanılması ve hastada gözlenen miyelotoksisiteye göre doz ayarlanması önerilmektedir. Başlangıç 6-MP ve MTX dozlarını tolere eden; ancak ilerleyen dönemde doz artışı yapılmayan hastalarda prognozun, lökopeni nedeniyle doz azaltılan veya hedef miyelosüpresyon sağlanana kadar doz arttırılan hastalara göre daha kötü olduğu gösterilmiştir. Karaciğer enzimlerindeki artış nedeniyle tedaviye verilen aralar relaps açısından risk oluşturmaktadır. Öte yandan yeni yapılan bir çalışmada, miyelosüpresyon ve enfeksiyonlar nedeniyle tedaviye ara verilme süresi ile relaps riski arasında bir ilişki gösterilememiştir (11).

2.9. İlaç Yanıtına Farklılıkların Araştırılmasında Kullanılan Moleküler Belirteçler

İnsan genom sekansının 2003 yılında tam olarak belirlenmesinden sonra hastalıkların genetik öğelerini inceleyen araştırmalarda büyük bir artış yaşanmıştır. Hastalık seyrini, tedavi etkinliğindeki farklılıkları, bireylerin sosyodemografik ve klinik özellikleri ile tek başına açıklamak yeterli olmamaktadır. Bu nedenle bilim adamları moleküler belirteçlerin hastalık etyopatogenezini, prognozunu ve tedavi etkinliğini nasıl değiştirdiğini anlamaya çalışmaktadır (22, 23).

DNA dizisi üzerinde bireysel varyasyonlar görülmektedir. Bu varyasyonlar DNA dizisini oluşturan adenin, guanin, sitozin, timin baz çiftinden birini içeren tek

nükleotit polimorfizmi (TNP) olabileceği gibi binlerce, milyonlarca baz büyüklüğündeki kopya sayısı değişimi (CNV) olabilir. Bu alanda sık kullanılan bazı terimler şunlardır (9):

- **Genetik polimorfizm:** Populasyon içinde belli bir gende farklı nükleotitlerin yer almasıdır. Bir genetik varyasyonun polimorfizm olarak tanımlanabilmesi için popülasyondaki sıklığının en az %1 olması gerekir.

- **Tek nükleotit polimorfizm (TNP):** İnsan genomunda en sık görülen genetik varyasyondur. Belli bir gendeki tek baz değişimidir. İki insan genomu kıyaslandığı zaman her 1000 baz çiftinde bir TNP bulunur. Pek çok TNP'in biyolojik bir önemi yokken, bir kısmı insanlar arasındaki işlevsel farklılıkların temelini oluşturur. TNP tespit çalışmaları ikiye ayrılır. Birincisi, önceden bilinmeyen bir polimorfizmin keşfedilmesi için DNA diziliminin taranmasıdır. İkincisi, bireylerin bilinen polimorfizmler için taranması yani genotiplendirilmesidir. Polimeraz zincir reaksiyonu genotiplendirme çalışmaları için yaygın kullanılan bir yöntemdir (24).

- **Kopya sayısı değişimi (CNV):** DNA dizilimlerinin binlerce, milyonlarca baz büyüklüğünde delesyon veya duplikasyonudur. TNP'den daha nadirdir. İnsan genomunun %1 ini oluşturur.

- **Allel:** Belli bir genle ilgili alternatif DNA dizilimidir.

- **Haplotip:** Allelik varyasyonların tümüdür.

- **Homozigot-heterozigot:** Aynı gen lokusundaki aleller aynı ise homozigot, farklı ise heterozigot durum olarak tariflenir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla yeni TNP'lerin tanımlanması, genomda sık bulunmaları ve kararlı bir şekilde dağılım göstermeleri nedeni ile ilişkilendirme çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır (25). İlişkilendirme çalışmaları, geniş populasyonda genetik varyantlar ile hastalıklar arasındaki ilişkiyi tespit etmek için kullanılır. Genetik varyasyonların incelenmesinde iki genel yaklaşım vardır. Bunlar genom boyu ilişkilendirme çalışmaları ve aday gen ilişkilendirme çalışmalarıdır. Birincisinde araştırmacı bilinmeyen bir polimorfizmin keşfedilmesi için çalışır. İkincisinde biyolojik yolak ile ilgili en olası genetik varyasyonların rolü araştırılır.

2.10. Farmakogenetik Tanımı ve Çalışmalar

İlaç metabolizmasına ve yanıtındaki farklılıklara genetik, epigenetik, çevresel (beslenme, ek ilaç kullanımı gibi) ve fizyolojik (yaş, cinsiyet, hastalık durumu, ırk) faktörler etki etmektedir. İlaç yanıtındaki farklılıkları araştıran bilim dalı klinik farmakolojidir. Farmakokinetik ve farmakodinamik alt dallarından oluşur (26).

- **Farmakokinetik:** İlacın emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı sırasındaki reaksiyonlardır. Temel olarak karaciğerde gerçekleşen faz 1 ve faz 2 reaksiyonlarından oluşur. Faz 1'deki oksidasyon, redüksiyon ve hidrolizden sitokrom P450 enzimleri sorumludur. İlacı daha hidrofilik hale dönüştürür. Faz 2 reaksiyonları ilacın asetat, glukuronik asit gibi moleküllerle konjugasyonudur. Klinikte sıklıkla bir ilacın atılımının gecikmesi sonucu konsantrasyon bağımlı toksisite görülür. İlacın hızla metabolize edilmesi ise toksik metabolitlerin vücutta birikmesine neden olur.

- **Farmakodinamik:** Bir ilacın vücutta yarattığı istenilen ve istenmeyen etkilerdir. İlaç reseptörleri ve sinyal iletiminde yer alan proteinler ilacın vücuttaki etkilerini belirler.

- **Farmakogenetik:** İlaçların bireyler arasında gösterdiği farmakokinetik ve farmakodinamik farklılıkların genetik temellerini araştıran bilim dalıdır. Farmakogenetik farklılıklara örnek olarak; süksinilkoline bağlı uzamış solunum kası paralizisi, malarya tedavisine bağlı hemoliz, izoniazide bağlı nörotoksisite, kodeine bağlı solunum yetmezliği verilebilir.

- **Farmakogenomiks:** Genom teknolojilerinin hastalık oluşumunu, ilaç yanıtlarını anlamak ve yeni ilaç geliştirilmesi için kullanılmasıdır.

- **Bireyselleştirilmiş tıp:** Hasta ve hastalıkların, genom teknolojilerini kullanarak kategorize edilmesidir. Böylece doğru zamanda, doğru ilacın, uygun hasta için kullanılması amaçlanır (9). Hastaların serumlarında ilaç düzeylerine bakılması ile ilaç konsantrasyon-zaman eğrisinin her hastada değişken olduğu gösterilmiştir. Bireyselleştirilmiş tıbbın ilk uygulamaları olmasına karşın, rutinde ilaç düzeyine bakmak her durumda hastalık sonucunu değiştirmemektedir.

- **Farmakogenetik polimorfizmler:** Tek bir gen lokusunu ilgilendirir, kalıtsaldır ve ilaç kullanımı sonrası farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olur.

Çoğu farmakogenetik polimorfizm gen kodlayan bölgerdeki DNA nokta mutasyonlarını (TNP), delesyonları, rearanjmanları ve amplifikasyonları içerir. Ancak intron bölgelerindeki mutasyonların da ilaç metabolizmasındaki farklılıklara yol açtığı gösterilmiştir. Yetişkin yaş grubunda yapılan geniş çaplı çalışmalara karşın çocuklarda farmakogenetik çalışmalar az sayıdadır. Aslında hastalıklar çocuklarda farklı seyretmekte ve çocuğun büyümesi, gelişmesi gen ekspresyonunu etkilemektedir. Bu durum yaşla beraber değişen farklı fenotiplere sebep olmaktadır. Bu nedenle yaşa özgü ilaç doz şemaları geliştirilmelidir (4).

Farmakogenetik üzerine yapılan çalışmalar her geçen yıl artmaktadır. Şu an kullanılan 100 kadar ilacın prospektüsünde farmakogenetik bilgilendirme vardır. Bazı ilaçların sık kullanımları ve önemi nedeniyle bu bilgilendirme daha ön plandadır. Şu ana kadar çocuklarda, klinik rehberlere girmiş ilaç öncesi rutin genotiplendirme gerektiren iki ilaç vardır: atomoksetin ve pimozid (26). Öte yandan genetik değişkenler ve tedavi öncesi genotiplemenin tedaviye kattığı değer tartışılmaktadır. Araştırmaların halen klinik uygulamalara tam yansımaması şöyle sıralanabilir (5):

- Çalışmaların küçük ölçekli olması,
- Yeterli klinik rehberlerin olmaması,
- Hekimlerin yeterli bilgisinin olmaması,
- Kanıta dayalı bilgilerin azlığı,
- Testlerin pahalı olması ve geç sürede sonuçlanmasıdır.

2.11. Pediatrik ALL Üzerine Farmakogenetik Çalışmalar

Bugün farmakogenetik çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında “bireyselleştirilmiş” tedaviden en çok fayda görecekten gruplardan birisi çocukluk çağı lösemisidir. Kemoterapideki gelişmelere bağlı olarak tedavi başarısı %80’leri aşsa da, halen tedaviye yanıt vermeyen bir grup hasta vardır. Aynı zamanda bazı hastalarda tedavi sırasında veya sonrasında ciddi yan etkiler ortaya çıkmaktadır.

6-MP ve MTX'a bağı yan etkiler poligenik olarak düzenlenmekte ve fenotipin ortaya çıkışında değişkenlerin birleşik rolü bulunmaktadır. Bundan dolayı, günümüzde hangi hastaların tedaviye dirençli olacağını veya ciddi yan etkiler yaşayacağını tespit eden belirteçler araştırılmaktadır. Böylece tedavi en baştan buna uygun olarak düzenlenebilecektir. Bu bağlamda, farmakogenetik çalışmaların çocukluk çağı ALL'sinde faydalı olacağına ilişkin sebepler aşağıdaki gibi sıralanabilir (27):

- ALL tedavi protokolleri geniş ve homojen bir grup hasta üzerinde belirli bir düzen içinde uygulanmaktadır. Bu grupla yapılacak çalışmalar istatistiksel olarak daha güçlü olacak ve sonuçların güvenilirliği artacaktır.
- ALL tedavisinde kullanılan MTX ve 6-MP gibi kemoterapi ilaçlarının çok dar bir terapötik aralığı vardır. Yani etkili doz ile toksik doz arasında çok ufak bir fark bulunur. Bu nedenle toksisiteyi önleyecek dozu ayarlamak zordur ve doz azaltımı yetersiz tedavi ile sonuçlanabileceği için tehlikelidir.
- ALL tedavisinde kullanılan ilaçların metabolik yolağındaki proteinleri kodlayan pek çok gen bulunmaktadır. Bu yollardaki proteinlerin düzeyi ve aktivitesinde bireyler arasında değişkenliğe sebep olan pek çok genetik varyant tanımlanmıştır. Bu varyasyonlar, dokulardaki ilaç konsantrasyonunu ve ilaç aktivitesini etkileyip tedavi yanıtını değiştirmektedir.

2.12. Tez Çalışmasında İncelenen Farmakogenetik Polimorfizmler

Bu tez kapsamında, çocuk ALL hastalarının idame tedavisinde kullandıkları farklı ilaç dozlarını ve yan etkilerini açıklamak üzere 6-MP ve MTX metabolizma yollarında yer alan şu aday genetik polimorfizmler analiz edilmiştir: *TPMT* geninde rs1142345, rs1800462 ve rs1800460; *ITPA* geninde rs1127354 ve rs7270101; *MTHFR* geninde rs1801131 ve rs1801133; *SLCO1B1* geninde rs4149056 ve rs11045879; *IMPDH2* geninde rs11706052; *PACSIN2* geninde rs2413739; *PYGL* geninde rs7142143 ve *ABCC4* geninde rs3765534, rs146708960 ve c.1667A>G. Bu genlere ilişkin çalışmalar aşağıda özetlenmiştir (Tablo 2.5):

- **TPMT (tiyopürin S-metiltransferaz):** Tiyopürin ilaçlarının S-metilasyonundan sorumlu sitoplazmada yer alan bir enzimdir. Bu enzim için vücuttaki normal substrat veya kofaktör bilinmemektedir. Tiyopürinler olmaksızın, TPMT eksikliği olan sağlıklı bireyler klinik ve biyokimyasal parametreler açısından normaldir. Eritrositlerdeki TPMT aktivitesi bireyler arasında çok değişken olup üçlü dağılım gösterir: güçlü, orta ve zayıf metabolize edenler. TPMT aktivitesinin düşük olmasına bağlı olarak sitotoksik 6-TGN artar (Şekil 2.5). Buna bağlı olarak orta veya düşük metabolize edenlerde, doz bağımlı miyelotoksisite görülmekte ve muhtemelen ikincil kanser sıklığı da artmaktadır (18).

TPMT geninde şu ana kadar tanımlanmış 30'dan fazla varyant bulunmaktadır. Normal alleli *TPMT*1* ifade eder. Irktan bağımsız olarak bu gendeki üç TNP, proteinin katalitik aktivitesinin kaybı ile sonuçlanan en sık mutant alelleri oluşturur. Bunlar: *TPMT*2* (G238C), *TPMT*3A* (G460A-A719G), *TPMT*3B* (G460A) ve *TPMT*3C* (A719G). *TPMT*3A* alleli, *TPMT*3B* ve *TPMT*3C* mutasyonlarının bir arada bulunmasından oluşur. Mutant alellere, *TPMT* geninin yer aldığı 6. kromozomda sırasıyla 5,7 ve 10. ekzonlardaki yanlış anlamlı mutasyonlar sebep olur. Otozomal ko-dominant kalıtım gösterir. Beyaz ırkta düşük aktiviteye sahip bireylerin %90'ında *TPMT*3A*, **3B* ve **3C* görülmektedir. *TPMT* heterozigot bireyler %5-10 sıklıkta görülür. *TPMT* homozigot bireyler ise 1/300 sıklıktadır. Bu hastalarda normal 6-MP dozlarında bile yaşamı tehdit eden miyelosupresyon gelişebilir (28, 29). Bazı ALL çalışma gruplarında idame tedavisindeki başlangıç 6-MP dozu *TPMT* genotipine bakılarak karar verilmektedir. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) klinik rehberine göre 6-MP normal dozunun, heterozigot mutasyona sahip hastalarda %50'si, homozigot mutantlarda ise %10'u olacak şekilde tedaviye başlanması önerilmektedir (30). Yapılan çalışmalarda, *TPMT* varyantına sahip hastalarda doz azaltılarak tedavi verilmesinin tedavi başarısını etkilemediği ve normal hastalar ile benzer toksisite sıklığına sahip olduğu gösterilmiştir. Eritrositlerdeki *TPMT* aktivitesinin ölçümü genotiplemeye alternatif olabilir. Ancak *TPMT* aktivitesi eritrosit yaşı ile ters orantılıdır. ALL'de eritrosit ömrü tedavi boyunca değişken olduğu için, hastaların *TPMT* aktivitesinin belirlenmesinde güvenilir değildir (31).

Türkiye’den TPMT polimorfizmi üzerine yapılmış çalışmalardan bir tanesine üniversitemiz de katılmış olup mutant allel sıklığı %0,9 olarak bildirilmiştir. Sadece TPMT *3A ve *3C mutant alelleri görülmüş ve TPMT*3A sıklığı diğer gruplara göre düşük saptanmıştır. Heterozigot veya homozigot mutant hastalar, 6-MP tedavisi sırasında daha ağır nötropeni ve enfeksiyon geliştirmiştir (32). Gazi Üniversitesi’nden yapılan çalışmada ise mutant *TPMT* allel sıklığı %8,6 olarak diğer etnik gruplarla benzer oranda bulunmuştur. İlk çalışmaya göre allel sıklığının fazla olması, TNP’lerin farklı bir teknoloji (DNA mikroarray) ile çalışılmasıyla açıklanmıştır (33). Aynı grup, *TPMT* homozigot varyanta sahip 15 yaşındaki bir T-ALL hastasında, 6-MP doz azaltımına karşın ağır pansitopeni saptamış ve bu hastaya steroid vererek kemik iliğinin hızlı bir şekilde toparlanması sağlanmıştır (34).

- ***ITPA (inozin trifosfat pirofosfataz):*** Pürin geri dönüşümünü sağlayarak hücreyi toksik moleküllerden korur. 20. kromozomda yer alan gendeki varyantlara bağlı düşük enzim aktivitesi, metilli tiyopürin metabolitlerinin artmasına neden olur (Şekil 2.5). Bu durum hepatotoksisite ve kemik iliği baskılanması ile ilişkilidir. Bunun sonucunda febril nötropeni sıklığında ve relaps riskinde artış gözlenebilir (35). Beyaz ırkta iki tane varyant nedeniyle enzim aktivitesi etkilenmektedir: ekzon 2’de yer alan c.94C>A (rs1127354) ve intron 2’deki IVS2+21A (rs7270101). Rs1127354 varyantının tek başına klinik etkisi tartışmalıyken, TPMT varyantı ile birleşince daha belirgin olmaktadır (36).

- ***MTHFR (metilen tetrahidrofolat redüktaz):*** Bu genle ilgili en sık çalışılan iki polimorfizm C677T (rs1801133) ve A1298C (rs1801131)’dir. MTX’a bağlı toksisite ile polimorfizm ilişkisi pek çok kez araştırılmış; ancak farklı gruplar çelişkili sonuçlar elde etmiştir. MTHFR varyantının, miyelosüpresyon ve mukozit riskini arttırdığını gösteren çalışmalar vardır (37). *MTHFR* mutasyonunun TPMT aktivitesini etkilediği, özellikle *TPMT* varyantı ile bir aradaysa MP ilişkili toksisiteye sebep olacağı düşünülmektedir (38).

- ***SLCO1B1/OATPB1B1 (solute carrier organic anion transporter family):*** Hepatositlerin membranında yer alır ve MTX’ın kandan karaciğere geçmesini sağlayarak safra yolu ile atılmasında görev alır. Yüksek doz MTX tedavisi alan hastalarda, SLCO1B1’deki polimorfizmler MTX’ın atılımını etkilemektedir.

SLCO1B1 geninde işlev kaybına neden olan rs4149056 ve rs11045879 kodlu mutasyonlar MTX'in vücuttan geç atılmasına neden olur ve gastrointestinal toksisite ile ilişkilidir. (39, 40).

- **IMPDH2 (inozin monofosfat dehidrogenaz):** IMPDH enzimi farklı genler tarafından kodlanan iki izoform IMPDH1 ve IMPDH2 olarak bulunur. IMPDH vücutta pürin sentezinde hız kısıtlayıcı basamakta yer alır. Tiyopürinlerin aktif moleküllere dönüştürülmesinde rol alır (Şekil 2.5). Bu enzimle ilgili inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) üzerine çalışmalar yapılmıştır. İBH'nda tiyopürinler yaygın olarak kullanılmaktadır; ancak hastaların %30'u tedaviye uygun yanıt vermemektedir. Lösemide olduğu gibi İBH'nda da, tiyopürin tedavisi ciddi hematotoksisiteye sebep olmakta, %40 hastada tedavi kesilmekte ve hastalık tekrar etmektedir. *TPMT* normal varyanta sahip hastalardaki yan etkileri açıklamak için 6-MP metabolizmasındaki diğer enzimler araştırılırken önemi fark edilmiştir. IMPDH enzimindeki düşük aktivite, tiyopürinlerin etkinliğini düşürüp ilaç direnci ile ilişkili olabilir (41, 42).

- **PACSIN 2 (protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2):** *TPMT* geninde mutasyon olmayan bazı hastaların 6-MP'e bağlı toksisiteye yatkın olduğu gözlenmiştir. *TPMT* aktivitesine etki eden TNP'ler araştırıldığında nöronlarda genel olarak eksprese olan *PACSIN2* genindeki rs2413739 kodlu polimorfizmin *TPMT* aktivitesi ile en çok ilişkili olduğu gösterilmiştir. Lösemi hücrelerinde *PACSIN2* mRNA'sı etkisizleştirildiğinde, *TPMT* aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Bu TNP aynı zamanda konsolidasyon tedavisi sırasında gastrointestinal toksisite ve mukozit ile ilişkilidir (43).

- **PYGL (Glycogen phosphorylase liver):** Adenozin monofosfat (AMP) molekülünün hedefidir ve 6-MP ve MTX yanıtında rol alır. Relaps olan çocuk ALL hastalarında yapılan bir çalışmada, rs7142143 bölgesindeki C allelinin, T alleleline göre 3,6 kat artmış relaps ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (44).

- **ABCC4/ MRP4 (ATP binding cassette 4, multidrug resistance protein 4):** MTX ve 6-MP'nin taşınmasından sorumludur. Hematopoetik hücrelerde yüksek oranda eksprese olması nedeniyle ilaçların fizyolojik ve toksik etkilerinden sorumludur. ABCC4, 6-TGN'lerin hücreden atılmasını sağlayarak hücreyi 6-MP'nin

toksik etkilerinden korur. *ABCC4* genindeki rs3765534 mutasyonu taşıyıcı proteinde işlev kaybına yol açtığı için miyelotoksisite ile ilişkilidir (45).



Tablo 2.5. Tez kapsamında çalışılan 6-MP ve MTX metabolizmasında yer alan genetik varyantlar ve potansiyel klinik etkileri (Allel sıklıkları Hapmap verisinden veya referanslardan elde edilmiştir.)

Gen	Gen bölgesi	rs ID	Genetik varyasyon	Farklı etnik gruplardaki allel sıklığı	Gen ekspresyonu veya protein üzerine etkisi	Genetik varyantın ilaç cevabı üzerine klinik etkisi
TPMT	6p22.3	rs1800462	(*2) c.238G>C	Avrupa: %0.5 Afrika: %0.3 Asya: %0	Protein yapısını bozarak proteolitik yoldan hızla yıkımına sebep olur.	6-TGN konsantrasyonu artar. Ciddi miyelöstipresyon riski (30)
		rs1800460	(*3B) c.460G>A	Avrupa: %0-3 Afrika: %0 Asya: %0		
		rs1142345	(*3C) c.719A	Avrupa: %1-3 Afrika: %3-5 Asya: %1-3		
ITPA	20p13	rs1127354	c.94C>A	Avrupa: %7-8 Afrika: %3-5 Asya: %11-15	Enzim aktivitesi azalır.	Febril nötropeni, hepatotoksisite ve trombositopeni riskinde artış (35, 36)
		rs7270101	IVS2+21A>C	Avrupa: %13 Afrika: %11 Asya: %0		
MTHFR	1p36.22	rs1801133	c.677C>T	Avrupa: %30 Afrika: %10 Asya: %35-50	Enzim aktivitesi azalır.	TPMT heterozigot olan çocuk ALL hastalarında 6-MP ilişkili toksisite riskinde artış (46)
		rs1801131	c.1298A>C	Avrupa: %35 Afrika: %10 Asya: %15-20		
SLCO1B1 (OATP1B1)	12p12.1	rs4149056	c.521T>C	Avrupa: %15 Afrika: %0.7 Asya: %11-13	MTX atılımı uzuyor (39). 6-MP etkisi üzerine çalışma yok.	MTX atılımını etkileyen en önemli varyant (39) İdame tedavisindeki 6-MP dozu daha düşük kullanılması ile ilişkili (47)
		rs11045879	c.1865+4846T>C	Avrupa: %16 Afrika: %15 Asya: %38-45		
IMPDH2	3p21.31	rs11706052	IVS7+10T>C	Avrupa: %11 Afrika: %2 Asya: %4-8	Çalışma yok	Böbrek nakli alıcılarında akut rejeksiyon riski (48)
PACSIN2	22q13.2	rs2413739	c.-78+13991G>A	Avrupa: %39 Afrika: %44 Asya: %3-5	Çalışma yok	TPMT aktivitesine etki eder GİS toksisitesi ile ilişkili (43)
PYGL	14q22.1	rs7142143	c.345+923A>G	Avrupa: %0 Afrika: %11 Asya: %0-7	Çalışma yok	ALL relapsı ilişkili (44)
ABCC4 (MRP4)	13q32.1	rs3765534	c.2269G>A	Avrupa: %1 Afrika: %1 Asya: %2-8	Çalışma yok	Yüksek 6-TGN konsantrasyonu ile lökopeni riskini artırır (45).
		rs146708960 Yok	c.2326G>A c.1667A>G	Yok Yok		

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'nda 2007-2014 yılları arasında tanı alıp takip edilen çocuk ALL hastalarında yapılmıştır. Araştırma, Ankara Üniversitesi Çocuk Genetik Hastalıkları ve Biyoteknoloji Enstitüsü ile birlikte yürütülmüştür.

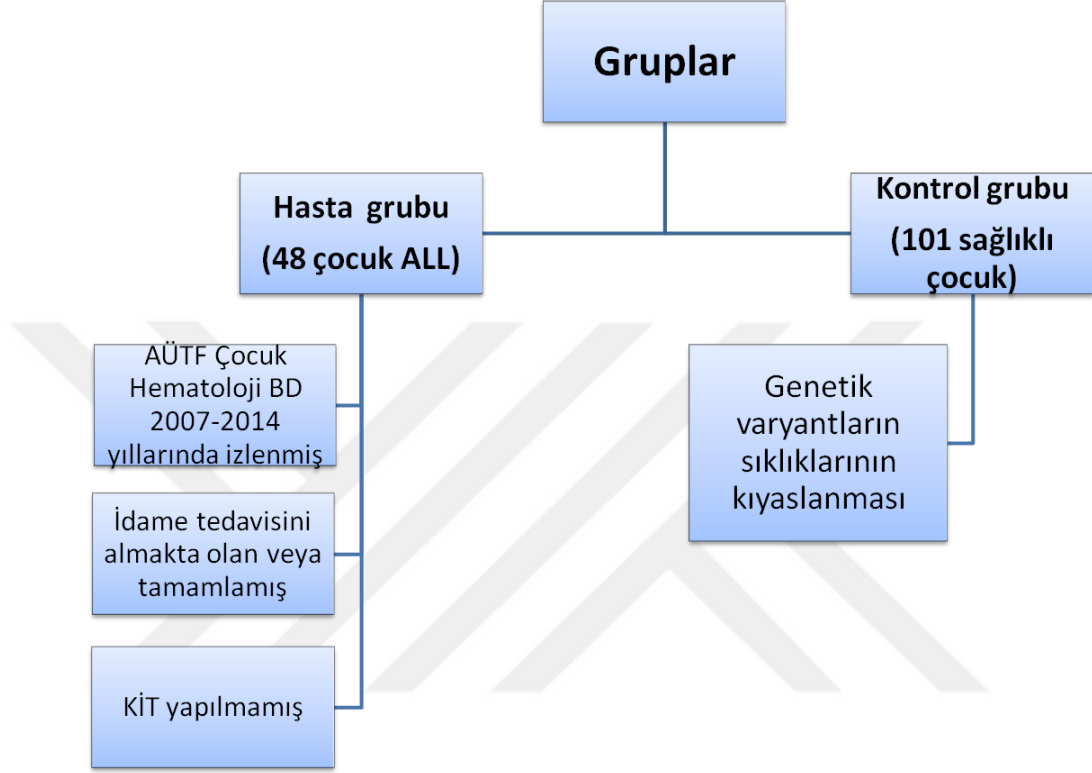
Araştırmanın yürütüldüğü yerlerde yapılan işlemler:

- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı
 - Hasta ve kontrol olgularına ait hasta bilgilerinin toplanması, düzenlenmesi ve analizi
 - Hasta ve kontrol olgularına ait kan örneklerinin toplanması
 - Hasta ve kontrol olgularına ait kan örneklerinin Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı, Moleküler Genetik Laboratuvarı' na uygun şartlarda saklanması ve deneylerde kullanılması için iletilmesi
- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı, Moleküler Genetik Laboratuvarı:
 - Hasta ve kontrol olgularına ait kan örneklerinin uygun şartlarda saklanması
 - Hasta ve kontrol olgularına ait kan örneklerinden DNA izolasyonu
 - KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) Genotipleme yöntemi ile hedeflenmiş TNP deneylerinin tasarımı, reaksiyona girecek örneklerin hazırlanması, sonuçların analizi
- Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Genom Bilim Laboratuvarı:
 - KASP Genotipleme yöntemi ile hedeflenmiş TNP deneyleri için hazırlanmış örneklerin ilgili demirbaş kullanımı ile yapılması

3.1. Olguların Seçimi

Çalışmaya, 1 Mayıs 2014 ve 1 Haziran 2015 tarihleri arasında poliklinikte değerlendirilen 48 çocuk ALL hastası ve 101 sağlıklı çocuk belirtilen kriterlere

uygun olarak alınmıştır (Şekil 3.1). Kontrol grubu, genetik varyantların sıklıklarının hasta grubu ile kıyaslanması için seçilmiştir. Çalışma öncesinde çocuklar ve ebeveynlerinden bilgilendirilmiş gönüllü onam alınmıştır.



Şekil 3.1. Araştırma grupları

Araştırmaya dahil olma kriterleri:

1. ALL tanısı almış olmak
2. ALL tedavisi görmekteyken 1 ay – 18 yaş arasında olmak
3. ALL protokolünün idame tedavisini alıyor veya tamamlamış olmak
4. Kontrol grubundaki bireylerin herhangi bir kronik hastalığının veya malignitesinin olmaması

Araştırmaya dahil olmama kriterleri:

1. ALL tedavisi sırasında 1 aydan küçük, 18 yaştan büyük olmak
2. Kemik iliği transplantasyonu yapılmış olmak

3. ALL tedavisi sırasında veya sonrasında hastanın ölmesi
4. ALL protokolüne göre henüz idame tedavisine başlamamış olmak
5. Kontrol grubundaki bireylerin kronik hastalığının veya malignitesinin olması

3.2. Metod

3.2.1. Hasta İzlem Formunun Doldurulması

Uygun ALL olgularının seçimini takiben, her bir hasta için hasta izlem formu doldurulmuştur (Şekil 3.2). Hasta bilgilerine, düzenli kayıtların yer aldığı hasta dosyalarından ulaşılmıştır. Hastaya ait demografik özellikler, lösemi tanı bilgileri, idame tedavisinde kullanılan 6-MP ve MTX ilaç dozları, idame tedavisi sırasında gözlenen ilaç yan etkileri, tedaviye ara verilme sayısı, süresi ve hastanın son durumu kaydedilmiştir.

3.2.2. Hastalarda İdame Tedavisinin Düzenlenmesi ve Tolere Edilen 6-MP/MTX Dozlarının Belirlenmesi

Hastalar tedavi edilirken esas olarak Children's Oncology Group (COG)'un hazırladığı araştırma protokolleri (COG AALL0331, AALL0232, AALL0434, CCG1952 ve CCG1961) kullanılmıştır. Hastalar genel bilgiler kısmında bahsedilen risk gruplarına göre sınıflandırılıp tedavi kolu belirlenmiştir. İndüksiyon ve konsolidasyon tedavilerinden sonra idame tedavisine geçilmiştir (Şekil 3.3).

HASTA İZLEM FORMU																													
<p>Hastaya ait genel özellikler: Ad-soyad: Dosya no: Doğum tarihi: İdame tedavisi sırasındaki yaşı: Cinsiyet: Yaşadığı şehir:</p>																													
<p>Lösemiye ait genel özellikler: Lösemiye yakınlık yaratan durum (çevresel faktör, eşlik eden hastalık, aile hikayesi):</p>																													
<p>Tanı tarihi: Protokol:</p>																													
<p>Lösemi tanısına yönelik özellikler: Başvuru şikayeti:</p> <ul style="list-style-type: none"> Ateş Halsizlik Vücutta morluklar/burun kanaması Kemik-kılem ağrısı Nefes darlığı Boyunda şişlik 																													
<p>Fizik muayene</p> <ul style="list-style-type: none"> Solukluk Etsesi, purpura Lenfadenopati Solumun sıkıntısı Hepatomegali Splenomegali Eklem şişliği Kirotomi Testiste kitle Santral sinir sistemi bulguları 																													
<p>Kan değerleri:</p> <ul style="list-style-type: none"> Hb: MCV: BK: TNS: Trombosit: LDH: Unk asit: 																													
<p>Beniferik yayma blast oranı:</p>																													
<p>Kemik iliği (Kİ) blast oranı:</p>																													
<p>Özel boyalar</p> <ul style="list-style-type: none"> FAS (azgüydik asit Şifri) MPO (miyeloperoksidaz) 																													
<ul style="list-style-type: none"> ANAE (Alfa naftil asetat esteraz): Dual esteraz: 																													
<p>Mediastende kitle:</p>																													
<p>BOS tutulumu:</p>																													
<p>Akım sitometri:</p>																													
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">T-hücre</th> <th colspan="2">B-hücre</th> <th>Intrastoplazmik</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CD2</td> <td>CD5</td> <td>CD10</td> <td>CD22</td> <td>CD79a</td> </tr> <tr> <td>CD3</td> <td>CD7</td> <td>CD19</td> <td>CD34</td> <td>IgM</td> </tr> <tr> <td>CD4</td> <td>CD8</td> <td>CD20</td> <td>CD79a</td> <td>CD22</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td>HLADR</td> <td>Tdt</td> </tr> </tbody> </table>					T-hücre		B-hücre		Intrastoplazmik	CD2	CD5	CD10	CD22	CD79a	CD3	CD7	CD19	CD34	IgM	CD4	CD8	CD20	CD79a	CD22				HLADR	Tdt
T-hücre		B-hücre		Intrastoplazmik																									
CD2	CD5	CD10	CD22	CD79a																									
CD3	CD7	CD19	CD34	IgM																									
CD4	CD8	CD20	CD79a	CD22																									
			HLADR	Tdt																									
<p>Akım sitometri sonucu:</p> <ul style="list-style-type: none"> B-ALL (ait grubu belirtiniz) T-ALL 																													
<p>Sitogenetik:</p>																													
<p>Moleküler genetik analiz:</p> <ul style="list-style-type: none"> T(12,21)(p13,q22) T(9,22)(q34,q11.2) 11q23MLL mutasyonları Trizomi 4 Trizomi 10 T(4,11)(q21,q23) T(11,14)(q24,q32) 13q14.3 delesyonu 																													
<p>Risk grubu:</p> <ul style="list-style-type: none"> Düşük Orta Yüksek 																													
<p>DNA indeksi:</p>																													
<p>29. gün Kİ blast oranı:</p>																													
<p>Tedavi yanıtı ve kolu:</p>																													
<p>İdame tedavisi ilaç dozları</p>																													
<p>6-MP dozu</p> <ul style="list-style-type: none"> Başlangıç 3 ay 6 ay 9 ay 12 ay 18 ay 24 ay 																													
<p>MTX dozu:</p> <ul style="list-style-type: none"> Başlangıç 3 ay 6 ay 9 ay 12 ay 18 ay 24 ay 																													
<p>İdame tedavisi ilaçlarının yan etkilerinin değerlendirilmesi</p>																													
<p>İdame tedavisi boyunca ortalama tam kan sayımı değerleri</p> <ul style="list-style-type: none"> Hb, BK: Trombosit: 																													
<p>İdame tedavisine ara verilme sayısı:</p> <ul style="list-style-type: none"> 6-MP MTX 																													
<p>Ara verilme nedeni:</p> <ul style="list-style-type: none"> Enfeksiyon Hepatotoksisite GIS yan etkileri Kemik iliği baskılanması Diğer (belirtiniz) 																													
<p>İdame tedavisi sırasında enfeksiyon:</p> <ul style="list-style-type: none"> Sayısı: Tipi (derecesini* belirtin) <ul style="list-style-type: none"> Fabril nötropani Kateter ilişkili Sepsis Ödagi belli olan enfeksiyon 																													
<p>İdame tedavisi sırasında hepatotoksisite (derecesini* belirtin):</p> <ul style="list-style-type: none"> Hepatomegali ALP, bilirubin, ALT, AST, GGT yüksekliği Albumin düşüklüğü Karaciğer yetmezliği Diğer 																													
<p>İdame tedavisi sırasında karşılaşılan gastrointestinal sistem yan etkileri (derecesini* belirtin):</p> <ul style="list-style-type: none"> Mukozit (oral, anal bölge) Bulantı/ kusma Kabızlık/ ishal GIS inflamasyonu (gastri, enterokolit, tiftit gibi) Pankreatit Diğer 																													
<p>Radyoterapi</p> <ul style="list-style-type: none"> Eyist (nedeni ve dozu): Hayır 																													
<p>* Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü'nün Yan Etki Ortak Terminoloji Kılavuzu Versiyon 4'e göre belirtiniz.</p>																													
<p>Tedavi bitiş tarihi (sona erdiyse):</p>																													
<p>Hastanın son durumu</p> <ul style="list-style-type: none"> Tedavisiz remisyonda izlem (Süre:) Relaps KIT Eksitüs Diğer 																													

Şekil 3.2. Hasta izlem formu

4.13.1 Maintenance (All Patients)

All patients receive common Maintenance therapy. Leucovorin will NOT be given after IT MTX to patients with Down syndrome.

Patient name or initials

DOB

Maintenance begins when peripheral counts recover to ANC $\geq 750/\mu\text{L}$ and $\text{plts} \geq 75,000/\mu\text{L}$. This count recovery applies to Maintenance Cycle 1. For subsequent cycles, please follow the dose modifications for low ANC or low plts . Maintenance occurs in 12-week cycles (84 days per cycle). Repeat 12-week Maintenance cycles until total duration of therapy is 2 yrs from start of IM1 for female pts (start of AIM1 for SR-High pts) and 3 yrs from start of IM1 for male pts (start of AIM 1 for SR-High pts). May stop therapy on anniversary date if the 5-day dex is completed for the cycle (i.e. complete all 5 days of dex before ending therapy), otherwise continue current cycle through dex administration. This Therapy Delivery Map is on one (1) page.

DRUG	ROUTE	DOSAGE	DAYS	IMPORTANT NOTES	OBSERVATIONS
Vincristine (VCR)	IV push over 1 min*	1.5 mg/m ² /dose every 4 wks	Days 1, 29 & 57	+ Or infusion via minibag as per institutional policy Maximum dose: 2 mg	a. Hx. phys. wgt (BSA) b. CBC/diff/plts c. CSF cell count, cytopsin
Dexamethasone (DEX)	PO	3 mg/m ² /dose BID x 5 days every 4 wks	Days 1-5, 29-33 & 57-61 (do not taper)	Total daily dose: 6 mg/m ² /day, divided BID See Sec 4.13 for administration guidelines	d. ALT, creatinine, bili
Mercaptopurine (MP)	PO	75 mg/m ² /dose/day	Days 1-84	See Section 4.13 & Appendix III for administration guidelines	e. HRQOL*
Methotrexate (MTX)	PO	20 mg/m ² /dose/week	Days 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71 & 78	Omit Day 1 dose as it coincides with IT MTX	! Obtain with each IT administration
Intrathecal Methotrexate (IT MTX)	IT	Age (yrs) Dose 1-1.99 8 mg 2-2.99 10 mg 3-8.99 12 mg ≥ 9 15 mg	Day 1 of each 12-week course	See Section 4.13 for administration guidelines Note: For SR-High or CNS3 patients, the maximum number of IT treatments is limited to 23 for females and 26 for males. Note age-based dosing	* For patients enrolled on HRQOL (see Section 15.0) OBTAIN OTHER STUDIES AS REQUIRED FOR GOOD PATIENT CARE

(A) COG-AALL0331 idame tedavisi

Reg # _____ Accession # _____ Reporting Period _____ Regimen _____ Page 1 of 3

4.8 MAINTENANCE Arms A (CMTX) and C (HDMTX) (NO Nelarabine) Week 30 until End of Therapy

Maintenance begins when peripheral counts recover with ANC $\geq 750/\mu\text{L}$ and platelets $\geq 75,000/\mu\text{L}$. Only Mercaptopurine and Methotrexate will be interrupted for myelosuppression as outlined in Section 5.9.

4.8.1 Maintenance Therapy Arms A (CMTX) and C (HDMTX) (84 days PER COURSE)

Drug	Route	Dose	Days
Vincristine (VCR)	IV Push Over 1 minute	1.5 mg/m ² (maximum dose 2 mg) q 4 weeks	Days 1, 29, 57
Dexamethasone (DEX)	PO	6 mg/m ² /day x 5 days q 4 weeks dose divided BID	Days 1-5, 29-33, 57-61
Mercaptopurine (MP)	PO	75 mg/m ²	Days 1-84
<i>(Give at least 1 hr after evening meal. To be taken without milk or citrus products. Adjust dose using 1/2 tablets and different doses on alternating days in order to attain a weekly cumulative dose as close to 525 mg/m²/week as possible. See Appendix I for details. See Section 5.9 for dose escalation during Maintenance).</i>			
Methotrexate (MTX)	PO	20 mg/m ² Weekly (See Section 5.9 for dose escalation during Maintenance)	Days 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78
Intrathecal Methotrexate (IT MTX) (note age-based dosing)	IT	Age(yrs) Dose 1 - 1.99 8 mg 2 - 2.99 10 mg 3 - 8.99 12 mg ≥ 9 15 mg	Day 1 Also at Day 29 of first 4 cycles of Maintenance therapy (Low Risk pts ONLY)

(B) COG-AALL0434 idame tedavisi

4.8.a MAINTENANCE

Maintenance begins when peripheral counts recover to with ANC \geq 750/ μ L and platelets \geq 75,000/ μ L. Only Mercaptopurine and Methotrexate will be interrupted for myelosuppression as outlined in Section 5.8.

Maintenance consists of repeated 12 week courses. The total duration of therapy is 2 years from the start of Interim Maintenance I for Female patients and 3 years from the start of Interim Maintenance I for Male patients. May stop therapy on anniversary date if dexamethasone is completed for the course. Otherwise continue current course through dexamethasone administration.

Drug	Rte	Dose	Days										
Vincristine (VCR)	IV Push	1.5 mg/m ² (maximum dose 2 mg) every 4 weeks	Days 1, 29, 57										
Dexamethasone (DEX)	PO	6 mg/m ² divided bid daily x 5days every 4 weeks	Days 1-5, 29-33, 57-61										
Mercaptopurine (MP)	PO	75 mg/m ²	Days 1-84										
Give at least 1 hr after evening meal. To be taken without milk or citrus products. Adjust dose using 1/2 tablets and different doses on alternating days in order to attain a weekly cumulative dose as close to 525 mg/m²/week as possible. See Appendix I for details. See Section 5.8 for dose escalation during Maintenance).													
Intrathecal Methotrexate (IT MTX) (note age-based dosing)	IT	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Age(yrs)</th> <th>Dose</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 - 1.99</td> <td>8 mg</td> </tr> <tr> <td>2 - 2.99</td> <td>10 mg</td> </tr> <tr> <td>3 - 8.99</td> <td>12 mg</td> </tr> <tr> <td>\geq 9</td> <td>15 mg</td> </tr> </tbody> </table>	Age(yrs)	Dose	1 - 1.99	8 mg	2 - 2.99	10 mg	3 - 8.99	12 mg	\geq 9	15 mg	Day 1 (RER pts, Day 29 also for first 4 courses ONLY)
Age(yrs)	Dose												
1 - 1.99	8 mg												
2 - 2.99	10 mg												
3 - 8.99	12 mg												
\geq 9	15 mg												
Methotrexate (MTX)	PO	20 mg/m ² Weekly (See Section 5.8 for dose escalation during Maintenance)	Omit Day 1 dose as it coincides with IT MTX. Days 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78										

(C) COG AALL0232 idame tedavisi

Şekil 3.3. COG protokolleri idame tedavisi şemaları

(A) AALL0331, (B) AALL0434, (C) AALL0232

Bu protokollere göre idame tedavisi, total nötrofil sayısı $>750/\mu$ L ve trombosit $>75,000/\mu$ L olunca başlatılmıştır. İdame tedavisi 12 haftalık (84 günlük) döngülerden oluşmaktadır. Risk grubuna göre tedavinin toplam süresi değişmektedir (49). Şekil 3.3'te işaretlendiği gibi, idame tedavisinde başlangıç 6-MP dozu 75mg/m²/gün ve MTX dozu 20mg/m²/hafta po olarak belirtilmiştir. Merkaptopürinin akşam yemeğinden en az iki saat sonra veya yemekten bir saat önce alınması hastalara söylenmiştir. Hastalar idame tedavisi sırasında düzenli aralıklarla poliklinikte değerlendirilmiştir. İlaç dozları; ağır ve uzun süreli nötropeniye girmeyip ağır enfeksiyonlara yol açmayacak şekilde ayarlanmıştır. Yani hastaların tolere edebildiği maksimum dozlardır. Protokole göre:

- TNS 500/ μ L'nin veya trombosit sayısı 50 000/ μ L'nin altına düşerse idame MP ve MTX bu değerlerin üstüne çıkana kadar kesilmiştir.
- Kan değerleri idame sırasında ilk kez düşüyorsa tekrar başladığı zaman aynı dozdan tedaviye devam edilmiştir.

- Eğer ikinci veya tekrarlayan kez mielosüpresyon yaşanır MP ve MTX; TNS >750/ μ L ve trombosit:>75 000/ μ L olana kadar kesilmiştir. İlaçlara kan değerleri uygun olup tekrar başladığında, eski doza 2-4 haftalık periyodlarla çıkılmaya çalışılır.
- İdamenin ilk döngüsünde doz arttırımı önerilmez. 2 hafta ara ile bakılan tam kan sayımında TNS>1500/ μ L olması halinde MP veya MTX dönüşümlü arttırılır.
- Dozlar arttırılmasına karşın TNS düşmüyorsa akla tedaviye uyumsuzluk gelmelidir.
- Üçüncü derece mukozit gelişirse MTX dozu %50 azaltılır, 4. derece mukozit olması halinde MTX tedavisine hasta düzeline kadar ara verilir.
- Karaciğer toksisitesi ile ilgili olarak direk bilirubin >2mg/dL veya ALT/AST >x20 ULN (evre 4 toksisite) olmadığı sürece tedaviye tam dozda devam edilir.
- Kemik iliği baskılanması, 2 haftadan uzun sürerse veya tedavi dozundan orantısız olursa *TPMT* genotiplendirmesi önerilmektedir. Hastaların %90'ında varyantları tespit etmek mümkündür. Kan ürünü almış olsa bile genotipleme sonucu, metabolitlerin kanda ölçülmesinden farklı olarak değişmemektedir. Eğer hasta *TPMT* homozigot varyanta sahipse, MP 10-20 mg/m²/gün olarak haftada üç gün verilmelidir. Heterozigot hastaların kemik iliği baskılanması yaşaması halinde doz %30-50 azaltılmaktadır. TNS yüksek gelmesi halinde, ilaç düzeyi kararlı hale gelene kadar 4 hafta boyunca doz arttırımı yapılmamaktadır (30).

Hastaların tolere ettikleri 6-MP/MTX dozları idame tedavisinin başlangıcı, 3., 6., 9. ve 12. aylardaki dozların ortalaması alınarak belirlenmiştir. Belirtilen aylarda tedaviyi aldıkları sıradaki kan sayımı değerleri kaydedilip ortalaması hesaplanmıştır. İdame tedavisine ara verilme sayısı, süresi ve nedeni kaydedilmiştir. İlaça bağlı toksisiteler Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü'nün Yan Etki Ortak Terminoloji Kılavuzu Versiyon 4'e (0=toksisite yok -- 4=en yüksek derecede toksisite) göre beş basamaklı derecelendirme şeması ile değerlendirilmiştir. Bu kılavuza göre:

- Derece 1: Hafiftir; klinik müdahale gerekmez.
- Derece 2: Orta; lokal tedavi yeterlidir. Yaşam kalitesini bozmaz.
- Derece 3: Ağır; hastane yatışı gerektirir. Kişisel bakımı aksattırır.
- Derece 4: Yaşamı tehdit eden sonuçlara sebep olabilir, acil müdahale gerekir.
- Derece 5: Yan etkiye bağlı ölüm.

Hasta ve kontrol olgularından rutin poliklinik başvurusu sırasında alınan periferik kan örneklerinden arta kalan kanlar kullanılmıştır. Bu araştırma sırasında hiçbir ek tedavi, kan veya idrar tetkiki yapılmamıştır.

3.2.3. Periferik Kan Örneklerinde Genetik Polimorfizmlerin Çalışılması

Hasta ve kontrol grubunun periferik kan örnekleri toplanarak çalışılana kadar -20°C’de saklanmıştır. DNA izolasyonu Nucleospin Genomic DNA from Blood (Macherey-Nagel, Clontech, ABD) kiti kullanılarak AÜTF Çocuk Genetik Laboratuvarı’nda yapılmıştır. *TPMT* geninde rs1142345, rs1800462 ve rs1800460; *ITPA* geninde rs1127354 ve rs7270101; *MTHFR* geninde rs1801131 ve rs1801133; *SLCO1B1* geninde rs4149056 ve rs11045879; *IMPDH2* geninde rs11706052; *PACSIN2* geninde rs2413739; *PYGL* geninde rs7142143 ve *ABCC4* geninde rs3765534, rs146708960 ve *ABCC4(C-1667A>G)* polimorfizmleri KASP ile AÜ Biyoteknoloji Enstitüsü’nde genotiplendirilmiştir.

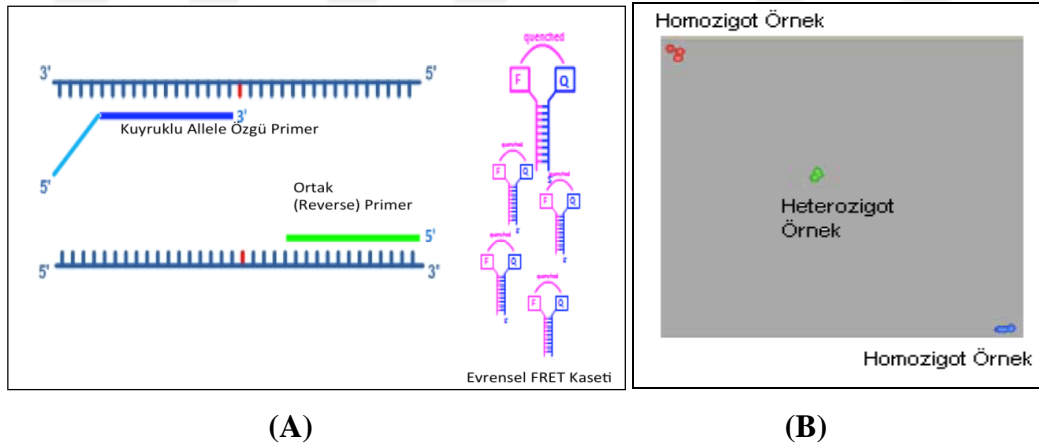
3.2.4. KASP Protokolü

KASP (**K**ompetitive **A**llele **S**pecific **P**CR), floresan temelli son nokta genotipleme teknolojisi olarak tanımlanmaktadır. KASP sistemi TNP genotiplendirmede genomik DNA içindeki belli bir lokustaki allelin belirlenmesinde kullanılan “Rekabetçi Allele Özgü PZR” ‘nun yeni bir formudur. Basit, maliyet etkin, esnek bir şekilde TNP tespitini sağlar (50).

Sistemde, araştırılan bölgedeki değişimlere özgü kuyruklu “forward primerler” ile birlikte ortak kullanılan bir “reverse primer” bulunmaktadır. 5’ ucu floresan ile

işaretleli 2 adet primer bulunur, ki bu primerlerden biri FAM diğeri de HEX ile işaretlidir. Bu oligo dizileri allele özgü primerlerin kuyruklarına bağlanacak şekilde dizayn edilmiştir. Bu iki primerin sinyali 3' uçta bulunan baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Bu şekliyle primerler "FRET kasedi" olarak nitelendirilirler (Şekil 3.4A).

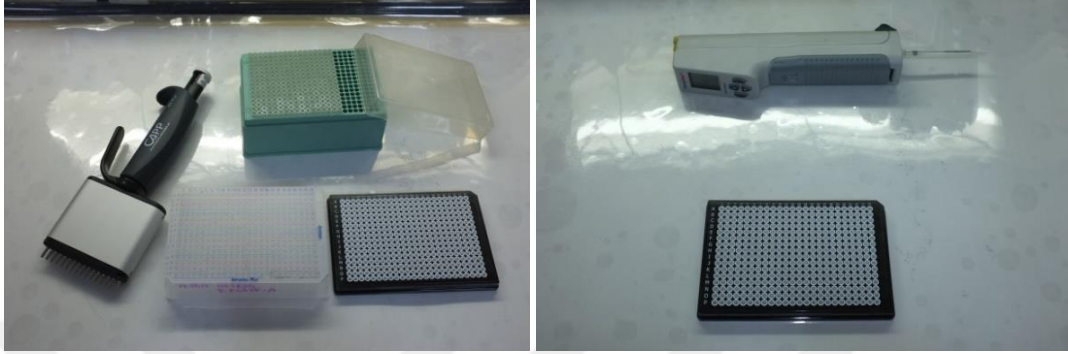
Polimeraz zincir reaksiyonun başlangıç aşamasında uygun allele özgü primerler, ilgili TNP'in bulunduğu bölgenin öncesinde yer alan tamamlayıcı diziye bağlanır. Ortak olarak kullanılan "reverse primer" 'in de bağlanmasıyla PZR başlamış olur. Bu faz boyunca baskılayıcı florokrom hala bağlı olduğundan sinyal alınmaz. Beklenen PZR ürünü oluşunca FRET kasedi tamamlayıcısı olduğu allele özgü primerlerin kuyruk bölgelerine bağlanır ve baskılayıcı boya ayrılır. Böylece floresan sinyal oluşur. İlgili TNP açısından genotip homozigot ise homozigotluk durumuna göre mavi ya da kırmızı sinyal alınır. (HEX; kırmızı: homozigot/ FAM; mavi: homozigot). Eğer birey heterozigot ise iki boyanın karışımı bir floresan sinyali alınır (HEX/FAM; yeşil: heterozigot) (Şekil 3.4B).



Şekil 3.4. (A) KASP teknolojisi FRET kaset şematik görüntüsü, (B) KASP teknolojisi sonuç penceresi

Reaksiyonlar 384'lük *plate*'lerde yapılmıştır. Örnek stoklanması için derin kuyulu *plate*'ler ve örnek dağıtılması için 16'lı çok kanallı pipet (Şekil 3.5A) ve reaksiyon karışımı dağıtılması için "repeater dispenser" pipetleri kullanılmıştır (Şekil 3.5B). Örnek ve reaksiyon karışımı eklenen *plate*'ler K-seal cihazı yardımı ile

üzeri naylon tabaka ile kapatılmıştır (Şekil 3.6). PZR amplifikasyonu için yüksek işlem hacimli 4 tane 384'lük *plate* bir arada reaksiyon yapabileceğimiz Hydrocycler cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.7).



(A)

(B)

Şekil 3.5. (A) 384'lük derin kuyulu stok örnek *plate*'den siyah-beyaz zebra çalışma *plate*'lerine örneklerin dağıtılması (B) Örnek dağıtılmış çalışma *plate*'lerine “repeater dispenser” pipet ile reaksiyon karışımının dağıtılması



Şekil 3.6. KASP deneylerinde *plate* üzerini kapatmak için kullanılan K-seal cihazı



Şekil 3.7. KASP deneylerinde kullanılan su banyosu temelli PZR’da kullanılan Hydrocycler cihazı

3.3. Araştırmanın Bütçesi

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimi tarafından 14L0230004 proje kodu ile desteklenmiştir.

3.4. Etik Kurul Onayı

Çalışmamız 10.03.2014 tarihinde 04-164-14 sayılı kurul kararı ile etik kurul onayı almıştır.

3.5. İstatistiksel Analiz

Ankara Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı’nda veriler analiz edilmiştir. Veriler değerlendirilirken istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 23.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri, tanımlayıcı istatistiksel metotlar (ortalama, ortanca, standart sapma, minimum, maksimum) ile düzenlendi. Gen sıklıkları Fisher exact testi ile hesaplanmıştır. Genetik polimorfizmler ve ilaç dozları arasında ilişkiye bakılırken nonparametrik testlerden Mann Whitney U ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Tedavi sırasında karşılaşılan

yan etkiler ile polimorfizmler arasında ilişki kurulurken ki-kare testi uygulandı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.



4. BULGULAR

Bu çalışmaya 1 Mayıs 2014 ve 1 Haziran 2015 tarihleri arasında Çocuk Hematoloji polikliniğinde izlenmiş olan 48 çocuk ALL hastası alınmıştır. Önce hastalarda lösemiye ilişkin tanımlayıcı istatistiklere yer verilmiştir. Sonrasında genetik polimorfizmler ve idame tedavisindeki rolüne ilişkin bulgular değerlendirilmiştir.

4.1. Hastaların Demografik ve Lösemi Tanısına İlişkin Tanımlayıcı Özellikleri

Çalışmaya alınan 48 hastanın 17'si (%35) kız, 31'i (%64) erkektir. Hastaların tanı anındaki ortalama yaşı 5,6 ($\pm 4,1$) idi. Lösemiye yatkınlık yaratan durumlarla ilişkili olarak; bir hasta Down sendromudur, iki hastanın ailesinde ise yoğun kanser öyküsü bulunmaktadır. Lösemi tanısı konulan hastaların ilk başvuru şikayetlerinden en sık olarak ateş ve halsizlik, 35 hastada (%72) görülmekteydi. Diğer yakınmalar; 12 hastada (%25) vücutta morluk, 16'sında (%33) ekstremitte ağrısı ve 3'ünde (%6) boyunda şişlikti. Başvuru fizik muayenesinde en sık bulgu, 40 hastada (%83) hepatomegali ve 31'inde (%64) splenomegali idi. Diğer fizik muayene bulguları; 13 hastada (%27) peteşi-purpura, birinde (%2) solunum sıkıntısı ve birinde (%2) artriti. 3 hastada (%6) mediasten ve bir hastada santral sinir sistemi tutulumu bulunmaktaydı (Tablo 4.1).

Hastaların lösemi tanısına yönelik yapılan tetkiklerinde başvurudaki ortalama hemoglobin (Hb): 8,2 g/dL; lökosit: 31 246/ μ L ve trombosit: 104 950/ μ L; LDH (Laktat dehidrogenaz): 1114 U/L ve ürik asit: 4,2 mg/dL idi (Tablo 4.2). Akım sitometri ile saptanan lösemi alt gruplarından 7 hastada (%35) erken pre B-ALL, 9'unda (%18) pre B-ALL, 4'ünde (%8) T-ALL ve 18'inde (%37) miyeloid varyant bifenotipik ALL görülmekteydi (Tablo 4.3). İlk başvuruda kemik iliğinden yapılan immünohistokimyasal boyamada 29 vakada PAS, 16 vakada asit fosfataz pozitifliği. PAS sadece lenfoid hücreleri boyarken, asit fosfataz hem lenfoid hem miyeloid blastları boyayabilir. Miyeloid varyant ALL olan bir vakada ise MPO ile boyanma saptandı.

Tablo 4.1. Hastaların akut lösemi başvurusundaki tanımlayıcı özellikleri

Toplam hasta sayısı	48	
Tanı anındaki ortalama yaş (yıl)	5,6 ($\pm 4,1$)	
	n	%
Cinsiyet		
Kız	17	35
Erkek	31	64
Başvuru yakınması		
Ateş	35	72
Halsizlik	35	72
Vücutta morluk	12	25
Ekstremitte ağrısı	16	33
Boyunda şişlik	3	6
Fizik muayene		
Solukluk	31	64
Peteşi-purpura	13	27
Lenfadenopati	28	58
Solunum sıkıntısı	1	2
Hepatomegali	40	83
Splenomegali	31	64
Eklem şişliği	1	2
Mediasten tutulumu	3	6
SSS tutulumu	1	2

Tablo 4.2. Hastaların ilk başvurudaki tam kan sayımı ve biyokimyasal değerleri

Bulgu	Ortalama \pmSS	Ortanca (min-max)
Hb (g/dl)	8,2 \pm 2,4	8,3 (3,0-13,5)
Lökosit (/ μ l)	31 246 \pm 133 832	8850 (2400-346000)
Trombosit (/ μ l)	104 950 \pm 1679	64 500 (11 000-791 000)
LDH (U/L)	1114 \pm 1679	557 (139-9526)
Ürik asit (mg/dL)	4,2 \pm 2,3	3,5 (1,1-12,8)

Kemik iliğinden yapılan sitogenetik incelemede 23 hastada yeterli metafaz elde edilememiş olup 11'inde (%22) anomali saptandı. Sitogenetik anomaliler arasında *MLL* gen rearanjmanı, *IGH* (*immunglobulin heavy chain*) ve *AML1/RUNX1* gen amplifikasyonu; trizomi 4, 8, 10, 17; t(12;21); t(1;19) ve t(9;22) yer almaktaydı.

Sitogenetik test ile saptanamayan bozukluklar, moleküler genetik inceleme ile tespit edilmiştir. Genetik bozukluk saptanan 31 hastada (%64) görülen anomaliler: kromozomdaki sayısal ve yapısal bozukluklar olarak özetlenebilir. İyi prognoz ilişkili olan sitogenetik değişiklikler hiperdiploidi, tri 4,10,17 ve t(12;21); kötü prognozla ilişkili olanlar hipodiploidi, t(9;22), t(4;11) ve *MLL* gen rearanjmanıdır. Buna göre hastaların 20'sinde (%41) olumlu, 8'inde (%16) olumsuz sitogenetik değişiklik saptanmıştır (Tablo 4.4).

İndüksiyon tedavisi sonrası 14. gün yapılan kemik iliği incelemesine göre hastaların 21'i (%43) RER ve 27'si (%56) SER koluna dahil edilmiştir. Risk gruplandırması kemoterapi planının belirlenmesi için yapılmıştır. Buna göre hastaların 28'i (%58) standart, 18'i (%37) yüksek ve 2'si (%4) çok yüksek risk grubuna dahil edilmiştir (Tablo 4.3). Çok yüksek risk grubundaki hastalardan birinde t(9;22), diğerinde *MLL* amplifikasyonu mevcuttur.

Tablo 4.3. Hastaların lösemi prognoz özelliklerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler

Özellikler	n	%
Akım sitometri		
Erken pre B-ALL	17	35
Pre B-ALL	9	18
T-ALL	4	8
Bifenotipik (my+)	18	37
Sitogenetik		
Yeterli metafaz saptanmadı	23	47
Normal	14	29
Anormal	11	22
Genetik değişiklikler		
Olumlu	20	41
Olumsuz	8	16
Risk grubu		
Standart	28	58
Yüksek	18	37
Çok yüksek	2	5
Tedavi kolu		
RER	21	43
SER	27	56

Tablo 4.4. Hastalarda tespit edilen genetik değişiklikler ve prognozla ilişkisi

Kromozom sayısal bozuklukları	Kromozom yapısal bozuklukları	Olumlu sitogenetik belirteçler	Olumsuz sitogenetik belirteçler
Psödohipodiploidi, hipodiploidi, hiperdiploidi,	t(1;19), t(4;11), t(9;22), t(12;21)	Hiperdiploidi	Hipodiploidi
tetrazomi 4, 21	MLL, IGH, RB1, ABL, BCL2 amplifikasyonu	tri 4, 10 ve 17	t(9;22), t(4;11)
monozomi 10, 13		t(12;21)	MLL gen rearanjmanı
der3 (derivative), der10			
trizomi X, 4, 8, 9, 10, 14, 17, 18			

4.2. Hastaların Lösemi İdame Tedavisi ve İlaç Yan Etkilerine İlişkin Tanımlayıcı Özellikler

Hastalara uygulanan tedavi protokolleri arasında COG AALL0331, AALL0232, AALL0434, CCG1952 ve CCG1961 yer almaktaydı. İdame tedavisi sırasında hastaların ortanca yaşı 6 (min-max: 1-18) idi (Tablo 4.5). İdame tedavisine kadar geçen ortalama süre 11,4 aydı.

Tablo 4.5. İdame tedavisine ilişkin tanımlayıcı özellikler

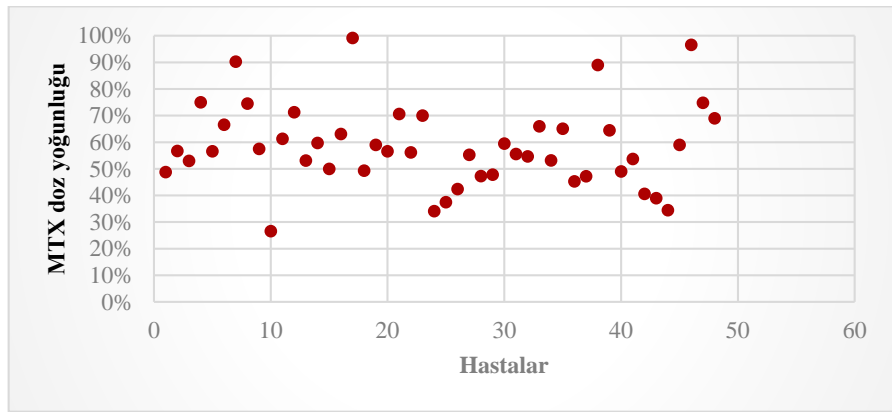
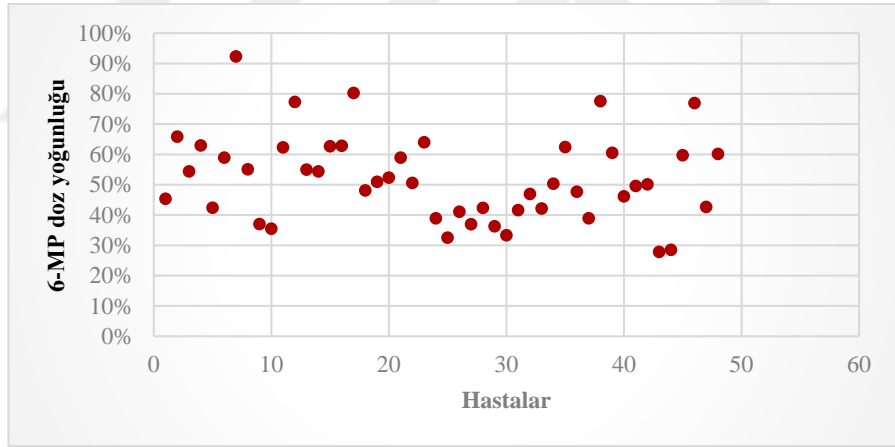
İdame tedavisi	Ortalama \pm SS	Ortanca (min-max)
Yaş	7,0 \pm 4,2	6 (1-18)
Başlayana kadar geçen süre (ay)	11,4 \pm 2,6	12 (5-17)

İdame tedavisine geçen hastaların tolere ettikleri MP ve MTX dozu ilk bir yıl içinde üç aylık periyodlarla tolere ettikleri dozların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Buna göre hastaların idame tedavisi sırasında kullandıkları ortalama MP dozu 39 mg/m²/gün ve MTX dozu 11,7 mg/m²/hafta idi. Standart tedavi şemasına bakıldığında idame tedavisinde önerilen başlangıç MP dozu: 75 mg/m²/gün ve MTX dozu: 20 mg/m²/hafta'dır (Tablo 4.6). Hasta grubumuzun ilaç dozlarını daha

düşük dozda tolere ettikleri belirlenmiştir. Şekil 4.1’de hastaların kullandıkları 6-MP ve MTX dozlarının standart dozlara bölünmesiyle hesaplanan (sırasıyla 75mg/m²/gün ve 20 mg/m²/hafta) doz yoğunlukları gösterilmiştir. Doz yoğunluğu 6-MP için %28-92 ve MTX için %27-99 arasındadır.

Tablo 4.6. İdame tedavisinde hastaların kullandıkları ve COG AALL0331 protokolünde önerilen 6-MP ve MTX tedavi dozları

	Ortalama	SS	Ortanca	Min-max	COG AALL0331
6-MP (mg/m ² /gün)	39,0	10,6	37,8	20,8-69,2	75mg/m ² /gün
MTX (mg/m ² /hafta)	11,7	3,1	11,3	5,3-19,8	20 mg/m ² /hafta



Şekil 4.1. İdame tedavisindeki (A) 6-MP ve (B) MTX yoğunlukları

İdame tedavisinin ilk bir yılında üç aylık periyodlarla 6-MP ve MTX ile eş zamanlı olarak tam kan sayımı değerleri kaydedilip ortalaması hesaplanmıştır (Tablo 4.7). Buna göre idame tedavisi sırasında hastaların ortalama Hb: 11.7 g/dL, lökosit: 3467/mm³ ve trombosit: 255 600/mm³ 'tür.

Tablo 4.7. İdame tedavisindeki tam kan sayımı değerleri

	Ortalama	SS	Ortanca	Min-max
Hb (g/dl)	11,7	0,8	11,8	9,6-14,5
Lökosit (/μL)	3467,8	1004,6	3322,5	1920-7040
Trombosit (x10 ³ /μL)	255,6	65,1	253,9	101,7-452,2

İdame tedavisi sırasında karşılaşılan yan etkiler enfeksiyon, hepatotoksisite ve GİS toksisitesidir. Toplam 48 hastadan, 44'ünde (%85) enfeksiyon, 30'unda (%65) hepatotoksisite ve 11'inde (%23) GİS toksisitesi görülmüştür. Enfeksiyonlar en sık olarak febril nütropeni ve odağı belli enfeksiyon olarak saptanmıştır. Amerikan Kanser Enstitüsü'nün İlaç Yan Etki Kılavuzu Versiyon 4'e göre derecelendirildiğinde üçüncü derece ve üstünde yan etki; 23 hastada enfeksiyona, 12 hastada karaciğer ve 2 hastada GİS toksisitesine bağlı gözlenmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. İdame tedavisi sırasında karşılaşılan yan etkiler

İdame sırasındaki yan etkiler ve dereceleri	n	%
Enfeksiyon	44	85
Derece 1-2	16	34
Derece 3-4	23	48
Hepatotoksisite	30	65
Derece 1-2	18	38
Derece 3	12	25
GİS toksisitesi	11	23
Derece 1-2	9	19
Derece 3	2	5

İdame tedavisine 7 hasta haricinde tüm hastalarda, ilaç yan etkileri sebebiyle zaman zaman ara verilmiştir. İdame tedavisine hasta başına ortalama 2 (min-max: 0-7) kez ara verilmiştir. Ara verilme süresi ise hasta başına ortalama 20 gündür (min-max: 0-78 gün). İdame tedavisine hastaların 38'inde (%79) kemik iliği baskılanması, 23 hastada (%47) enfeksiyon, 8'inde (%19) hepatotoksisite sebebiyle ara verilmiştir. İdame tedavisine en sık ara verilme sebebi, enfeksiyonlar ve kemik iliği baskılanmasına bağlı sitopenilerdir. Enfeksiyonlardan en sık febril nötropeni ve bir hastada kateter ilişkili sepsis, tedaviye ara verilmesine sebep olmuştur. Gastrointestinal sistem toksisitesi ise ara vermeye sebep olmamıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Hastaların idame tedavisine ara verilmesine ilişkin tanımlayıcı istatistikler

Özellikler	Ortanca	Min-max
Tedaviye ara verme sayısı	2,0	0-7
Tedaviye ara verme süresi (gün)	20,5	0-78
	n	%
Ara verme sebepleri		
1. Kemik iliği baskılanması	38	79
2. Enfeksiyon	23	47
Febril nötropeni	17	35
3. Hepatotoksisite	8	19
4. GİS toksisitesi	0	0

Kullanılan ilaç dozları cinsiyetler arasında farklılık göstermezken; erkek hastalarda idame tedavisine yan etkilere bağlı olarak daha sık ara verildiği (Mann Whitney U testi; p=0,006 Tablo 4.10); erkek hastaların daha sık febril nötropeni geçirdiği saptanmıştır (Ki-kare testi; p=0,011) (Tablo 4.11).

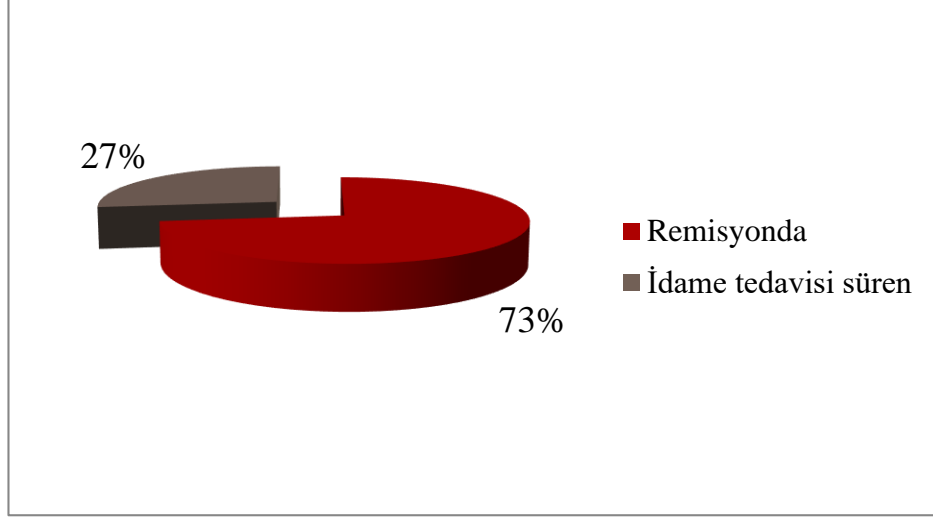
Tablo 4.10. İlaç dozları ve idame tedavisine ara verme durumunun cinsiyete göre dağılımı

	Cinsiyet	n	Ortalama	Standart sapma	p-değeri
MP dozu mg/m²/gün	kız	17	38,95	10,64	0,923
	erkek	31	39,13	10,85	
MTX dozu mg/m²/hafta	kız	17	11,81	3,05	0,698
	erkek	30	11,68	3,21	
Ara verme süresi (gün)	kız	17	15,41	15,12	0,052
	erkek	31	25,81	18,34	
Ara verme sayısı	kız	17	1,59	1,50	0,006
	erkek	31	3,16	1,92	

Tablo 4.11. İdame tedavisi sırasında görülen yan etkilerin cinsiyetlere göre dağılımı

Yan etki		Kız	Erkek	Ki-kare p- değeri
Febril nötropeni	yok	15	16	0,011
	var	2	15	
Odağı belli enfeksiyon	yok	4	6	0,733
	var	13	25	
Hepatotoksisite	yok	4	12	0,309
	var	12	18	
GİS toksisitesi	yok	14	21	0,185
	var	2	9	

Tedavi süresince 12 hasta kranial radyoterapi almıştır. On bir hastaya profilaksi, tanıda SSS tutulumu olan bir hastaya ise tedavi amaçlı radyoterapi verilmiştir. Hasta grubunun son durumu değerlendirildiğinde 13'ünün (%27) tedavisi devam etmekte, 35'i (%73) ise hastalısız izlenmektedir (Şekil 4.2). Remisyonda olan hastalar ortalama 29 ± 22 aydır (ortanca:24 min:2, max:80) tedavisiz takip edilmektedir. Hastalardan biri relaps olmuş, tekrar tedavi sonrası remisyonda izlenmektedir.



Şekil 4.2. Lösemi hastalarının son durumu

4.3. Genetik Polimorfizmlere İlişkin Tanımlayıcı Analizler

Çalışmamızın ikinci aşamasında hasta ve kontrol grubunda 6-MP ve MTX metabolizmasında yer alan 15 tek nükleotit polimorfizm KASP ile genotiplendirilmiştir. KASP ile yapılan genotiplendirmenin sağlaması açısından üniversitemizde RT-PZR (real time-polimeraz zinciri reaksiyonu) ile çalışılmakta olan *MTHFR* genotiplendirmesi ile hasta grubumuz karşılaştırılmıştır. Çocuk Genetik BD'nda, 33 hastanın *MTHFR* rs1801133 (C677G) genotiplendirmesine bakıldığı ve bunların çalışmamızdaki sonuçlarla örtüştüğü görülmüştür.

Allel ve genotip frekansları hesaplanırken SHEsis programı kullanılmıştır (51). P değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır. Tablo 4.12'da belirtildiği gibi allel sıklıkları belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları bakımından farklılık saptanmamıştır.

Tablo 4.12. Hasta ve kontrol grubundaki allel sıklıkları

TNP	Allel	Hasta	Kontrol	P değeri	MAF*
1) rs1800460 TPMT*3B	A	86 (1,0)	196 (1,0)	-	
	G	0	0		0,027
2) rs1142345 TPMT*3C	A	89 (0,94)	197 (0,98)	0,06	
	G	5 (0,053)	3(0,015)		0,036
3) rs1800462 TPMT*2	G	94 (0,97)	197 (0,99)	0,20	
	C	2 (0,021)	1 (0,005)		0,0014
4) rs11706052 IMPDH2	A	84 (0,93)	171 (0,86)	0,08	
	G	6 (0,06)	27 (0,13)		0,052
5) rs1801133 MTHFR	C	67 (0,71)	145 (0,72)	0,82	
	T	27 (0,28)	55 (0,27)		0,30
6) rs1801131 MTHFR	A	48 (0,54)	133 (0,66)	0,053	
	C	40 (0,45)	67 (0,33)		0,29
7) rs11045879 SLCO1B1	T	84 (0,91)	164 (0,82)	0,056	
	C	8 (0,087)	34 (0,17)		0,21
8) rs4149056 SLCO1B1	T	80 (0,88)	171 (0,85)	0,43	
	C	10 (0,11)	29 (0,14)		0,087
9) rs1127354 ITPA	C	89 (0,96)	187 (0,93)	0,25	
	A	3 (0,03)	13 (0,06)		0,089
10) rs7270101 ITPA	A	80 (0,88)	182 (0,91)	0,57	
	C	10 (0,11)	18 (0,09)		0,059
11) rs2413739 PACSIN2	C	51 (0,55)	113 (0,58)	0,65	
	T	41 (0,44)	81 (0,41)		0,362
12) rs3765534 ABCC4	C	89 (0,94)	197 (0,98)	0,06	
	T	5 (0,05)	3 (0,015)		0,312
13) rs146708960 ABCC4	C	94 (0,97)	199 (0,99)	0,20	
	T	2 (0,02)	1 (0,005)		-
14) c.677A>G ABCC4	A	93 (0,98)	199 (0,99)	0,58	
	G	1 (0,01)	1 (0,05)		-
15) rs7142143 (PYGL)	T	94 (1)	200 (1)		0,03

*MAF (Minor allele frequency): Bir popülasyonda en nadir görülen allelin sıklığı. Eğer ikiden fazla allel varsa ikinci en sık görülen alleli işaret eder. Popülasyon genetiğinde sık ve nadir görülen varyantlar hakkında bilgi verir. HapMap, 1000 genome gibi projelerle ortaya konmuştur (52).

Allel sıklıklarının yanı sıra genotip sıklıklarına da bakılmıştır. Hardy Weinberg (HWE) kuralına göre genotip dağılımı değerlendirilmiştir. Tablo 4.13'te hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımları ve Hardy-Weinberg kuralına göre dengede durumu değerlendirilmiştir.

- Hasta ve kontrol grubunda genotip dağılımı bakımından rs11706052 (*IMPDH2*) ($p=0.006$) ve rs3765534 (*ABCC4*) ($p=0.01$) varyantlarında fark mevcuttur. Kontrol grubunda rs11706052 varyantı, hasta grubunda ise rs3765534 varyantı daha sıktır.
- Diğer genotiplerin dağılımında hasta ve kontrol grubunda farklılık saptanmamıştır.
- Hasta ve kontrol grubunda HW dengesi değerlendirildiğinde rs1142345 (*TPMT*) ve rs11706052 (*IMPDH2*) varyantlarında denge korunmamaktadır. Kontrol grubunda ayrıca rs2413739 (*PACSIN2*), rs3765534 (*ABCC4*) varyantları dengede değildir. Diğer varyantların hepsinde hasta ve kontrol grubunda HW dengesi vardır.

Tablo 4.13. Hasta ve kontrol grubunda tek nükleotit polimorfizm genotiplerinin dağılımı ve Hardy-Weinberg dengesi

TNP	Genotip	Hasta grubu	Hasta HWE-P değeri	Kontrol grubu	Kontrol HWE-P değeri	P-değeri
1) rs1800460 TPMT	AA	43 (1,0)		98 (1,0)		
		0		0		
2) rs1142345 TPMT	AA	44	<0,001	98	<0,001	0,36
	AG	1 (0,02)		1 (0,01)		
	GG	2 (0,04)		1 (0,01)		
3) rs1800462 TPMT	GG	46 (0,95)	0,88	98 (0,99)	0,95	0,20
	GC	2 (0,04)		1 (0,01)		
4) rs11706052 IMPDH	AA	41 (0,91)	<0,001	73 (0,73)	<0,001	0,006
	AG	2 (0,04)		25 (0,25)		
	GG	2 (0,04)		1 (0,01)		
5) rs1801133 MTHFR	CC	23 (0,48)	0,53	51 (0,51)	0,43	0,97
	CT	21 (0,44)		43 (0,43)		
	TT	3 (0,06)		6 (0,06)		
6) rs1801131 MTHFR	AA	13 (0,29)	0,95	46 (0,46)	0,42	0,15
	AC	22 (0,50)		41 (0,41)		
	CC	9 (0,20)		13 (0,13)		
7) rs11045879 SLCO1B1	TT	39 (0,84)	0,22	68 (0,68)	0,95	0,11
	TC	6 (0,13)		28 (0,28)		
	CC	1 (0,02)		3 (0,03)		
8) rs4149056 SLCO1B1	TT	36 (0,80)	0,50	71 (0,71)	0,08	0,12
	TC	8 (0,17)		29 (0,29)		
	CC	1 (0,022)		0		
9) rs1127354 ITPA	CC	43 (0,93)	0,81	87 (0,87)	0,48	0,24
	AC	3 (0,06)		13 (0,13)		
10) rs7270101 ITPA	AA	36 (0,80)	0,50	84 (0,84)	0,14	0,83
	AC	8 (0,17)		14 (0,14)		
	CC	1 (0,02)		2 (0,02)		
11) rs2413739 PACSIN2	CC	16 (0,34)	0,26	38 (0,39)	0,03	0,87
	CT	19 (0,41)		37 (0,38)		
	TT	11 (0,23)		22 (0,22)		
12) rs3765534 ABCC4	CC	42 (0,84)	0,70	98 (0,98)	<0,001	0,01
	CT	5 (0,10)		1 (0,01)		
	TT	0		1 (0,01)		
13) rs146708960 ABCC4	CC	46 (0,95)	0,88	99 (0,99)	0,95	0,20
	CT	2 (0,04)		1 (0,01)		
14) c.677A>G ABCC4	AA	46 (0,97)	0,94	99 (0,99)	0,95	0,58
	AG	1 (0,02)		1 (0,01)		
15) rs7142143 PYGL	TT	47 (1)		100 (1)		

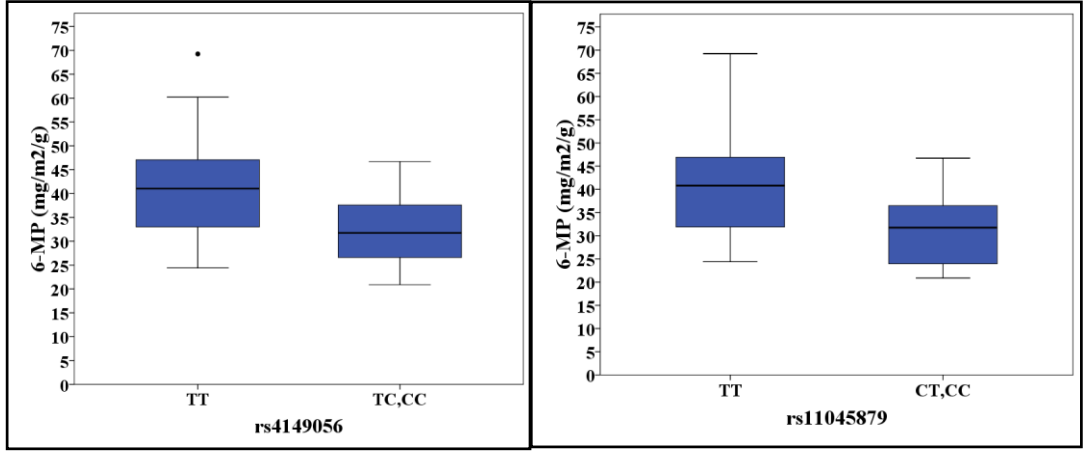
4.4. Genetik Polimorfizmlerin İdame Tedavisindeki 6MP/MTX Dozları ile İlişkisi

Çalışmamızdaki en önemli amaçlardan biri hastaların kullandıkları 6-MP ve MTX doz farklılıkları ile farmakogenetik polimorfizmlerin ilişkisini araştırmaktır. Tablo 4.14'te hastaların kullandıkları ilaç dozlarının genotiplere göre dağılımı verilmiştir. P değeri Mann Whitney U testi ile hesaplanmıştır ($p < 0,05$). Rs1800460 ve rs7142143 genlerinde varyasyon saptanmadığı için tabloya alınmamıştır. Buna göre bakılan 15 TNP'den iki tanesi arasında ilişki bulunmuştur. *SLCO1B1* geninde yer alan rs4149056 ve rs11045879 varyantlarına sahip hastaların anlamlı olarak daha düşük dozda 6-MP ve MTX'ı tolere ettikleri gösterilmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4). *SLCO1B1* geninde rs4149046 varyantına sahip hastaların kullandıkları ortalama 6-MP dozu $31,9 \text{ mg/m}^2/\text{gün}$ iken, normal allele sahip olanların $41,4 \text{ mg/m}^2/\text{gün}$ 'dür ($p=0,014$). *SLCO1B1* geninde rs11045879 varyantına sahip hastalar ortalama $31,4 \text{ mg/m}^2/\text{gün}$ 6-MP alırken, normal bireyler $40,7 \text{ mg/m}^2/\text{gün}$ dozda ilacı tolere etmektedir ($p=0,036$). Benzer şekilde MTX'ı, rs11045879 varyantına sahip hastalar $9 \text{ mg/m}^2/\text{hafta}$ 'dan; rs4149056 varyantına sahipse $8,9 \text{ mg/m}^2/\text{hafta}$ olarak daha düşük dozda tolere etmektedir ($p=0,013$ ve $p=0,001$).

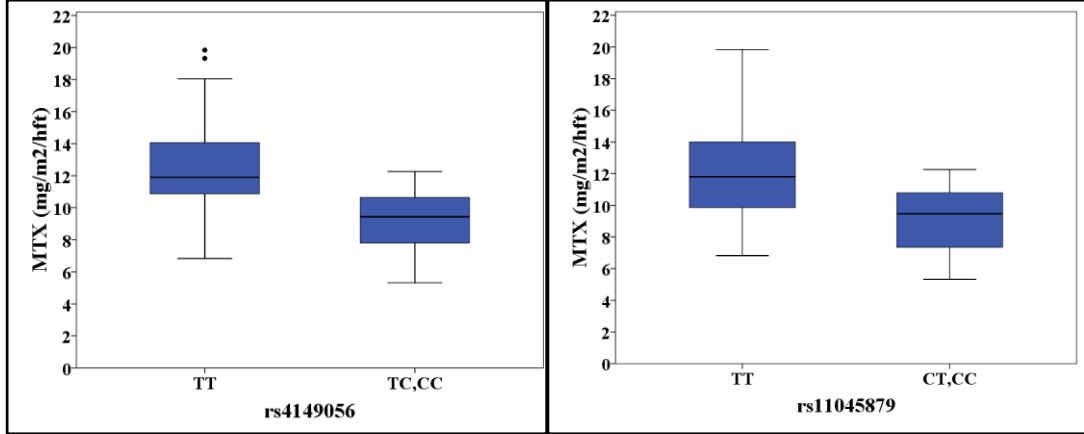
Bağlantı dengesizliği katsayısı (D), bir lokusta bulunan genotipin, bir başka lokusta bulunan genotip ile ne kadar rastgele olmadan ilişkili olduğunu hesaplamayı sağlayan bir değerdir. Yani iki allelin tesadüfi olmayan birlikteliğidir. Buna göre *SLCO1B1* rs4149056 ve rs11045879 arasında bağlantı dengesizliği (LD: *linkage disequilibrium*) (D' : 0.99 ve r^2 :0.78) saptanmıştır.

Tablo 4.14. Farmakogenetik polimorfizmlerin 6-MP ve MTX dozları ile ilişkisi

TNP/Gen	Genotip	n	Ortalama MP dozu		Ortalama MTX dozu	
			mg/m ² /gün	p-değeri	mg/m ² /hafta	p-değeri
rs1142345 TPMT	AA	44	39,27	0,69	11,80	0,67
	AG,GG	3	36,81		10,99	
rs1800462 TPMT	GG	46	39,50	0,11	11,81	0,26
	GC	2	29,25		9,77	
rs11706052 IMPDH2	AA	41	39,56	0,76	11,64	0,055
	AG, GG	4	39,43		13,78	
rs1801133 MTHFR	CC	23	40,01	0,43	11,79	0,93
	CT, TT	24	38,65		11,70	
rs1801131 MTHFR	AA	13	37,97	0,709	11,40	0,802
	AC, CC	31	40,17		12,02	
rs11045879 SLCO1B1	TT	39	40,78	0,036	12,26	0,013
	CT, CC	7	31,47		9,05	
rs4149056 SLCO1B1	TT	36	41,46	0,014	12,57	0,001
	TC, CC	9	31,90		8,99	
rs1127354 ITPA	CC	43	39,56	0,894	11,83	0,649
	CA	3	36,45		10,83	
rs7270101 ITPA	AA	36	39,97	0,465	11,75	0,950
	AC	8	37,12		12,07	
rs2413739 PACSIN2	CC	16	40,91	0,273	11,76	0,463
	TC, TT	30	38,53		11,76	
rs3765534 ABCC4	CC	42	39,53	0,427	11,94	0,341
	CT	5	35,58		10,13	
rs146708960 ABCC4	CC	46	39,50	0,110	11,81	0,268
	CT	2	29,25		9,77	
c.677A>G ABCC4	AA	46	39,36	0,210	11,76	0,735
	AG	1	27,70		11,06	



Şekil 4.3. SLCO1B1 genindeki rs4149056 ve rs11045879 varyantlarının 6-MP dozu ile ilişkisinin kutu grafiği



Şekil 4.4. SLCO1B1 genindeki rs4149056 ve rs11045879 varyantlarının MTX dozu ile ilişkisinin kutu grafiği

Diğer yapılan analizlere göre, 6-MP/MTX dozları ile:

- Yaş ve cinsiyet,
- İlk başvuru şikayetleri, fizik muayene bulguları ve kan değerleri,
- Lösemi alt tipi, risk grubu ve tedavi kolu,
- İdame tedavisi sırasında karşılaşılan yan etkiler ve tedaviye ara verme süreleri arasında ilişki saptanmamıştır.

4.5. Genetik Polimorfizmlerin İdame Tedavisinde Karşılaşılan Yan Etkiler ile İlişkisi

On beş adet TNP ile lösemiye ait özellikler ve idame tedavisi sırasında karşılaşılan yan etkiler (enfeksiyon, kemik iliği baskılanması, karaciğer ve GİS toksisitesi) değerlendirilmiştir. Buna göre:

- *TMPT* varyantına sahip hastalarda, normal genotipe göre daha uzun süre idame tedavisine ara verilmiştir. *TPMT* rs1142345 varyantına sahip olanlar ortalama 47 gün ($p=0,02$), rs1800462 varyantına sahip olanlar ise 27 gün idame tedavisine ara vermiştir (Tablo 4.15). Tedaviye ara verme sıklığı ve süresi ile ilgili olarak diğer varyantlar arasında ilişki saptanmamıştır.
- Bu sonuçlar dışında genetik polimorfizmler ile (tablo 4.15):
 - Yaş ve cinsiyet,
 - Başvuru kan değerleri,
 - İdame tedavisine ara verme süresi,
 - İdame tedavisi sırasındaki ortalama tam kan sayımı değerleri,
 - İdame tedavisi sırasında gözlenen yan etkiler arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Tablo 4.15. Hastalardaki genetik polimorfizmler ile idame tedavisi özellikleri*

			İdame tedavisi sırasındaki ortalama tam kan sayımı değerleri						İdame tedavisine ara verme süresi (gün)	
			Hb		Lökosit		Trombosit		Gün	P-değeri
TNP/Gen	Genotip	n	g/dL	P-değeri	/µL	p-değeri	X10 ³ /µL	P-değeri	Gün	P-değeri
rs1142345	AA	44	11,7	0,711	3560,8	0,107	261,0	0,139	20,25	0,020
TPMT	AG,GG	3	11,7		2560,0		219,9		47,00	
rs1800462	GG	46	11,7	0,278	3498,6	0,340	258,2	0,071	21,91	0,605
TPMT	GC	2	12,5		2760,0		197,1		27,00	
rs11706052	AA	41	11,7	0,705	3549,7	0,780	262,6	0,577	22,15	0,749
IMPDH2	AG, GG	4	11,6		3325,0		245,7		17,50	
rs1801133	CC	23	11,8	0,725	3717,2	0,205	266,6	0,496	17,65	0,153
MTHFR	CT, TT	24	11,6		3284,2		247,7		25,75	
rs1801131	AA	13	11,7	0,787	3555,4	0,918	247,5	0,487	23,15	0,424
MTHFR	AC, CC	31	11,8		3525,7		267,1		20,55	
rs11045879	TT	39	11,7	0,611	3515,8	0,834	255,8	0,765	19,97	0,106
SLCO1B1	CT, CC	7	11,8		3585,7		282,1		30,71	
rs4149056	TT	36	11,7	0,820	3590,4	0,356	256,4	0,590	19,53	0,132
SLCO1B1	TC, CC	9	11,6		3286,7		280,1		30,56	
rs1127354	CC	43	11,7	0,136	3553,4	0,449	260,8	0,463	20,86	0,135
ITPA	CA	3	12,2		3140,0		245,3		32,33	
rs7270101	AA	36	11,6	0,273	3528,5	0,223	258,8	0,447	22,03	0,532
ITPA	AC	8	12,3		3738,8		262,9		17,00	
rs2413739	CC	16	11,6	0,773	3583,2	0,917	259,9	0,972	22,00	0,808
PACSIN2	TC, TT	30	11,8		3496,2		259,7		21,40	
rs3765534	CC	42	11,7	0,468	3566,6	0,152	263,0	0,098	20,76	0,178
ABCC4	CT	5	12,1		2912,0		219,8		32,00	
rs146708960	CC	46	11,7	0,278	3498,6	0,340	258,2	0,071	21,91	0,605
ABCC4	CT	2	12,5		2760,0		197,1		27,00	
c.677A>G	AA	46	11,7	0,121	3526,4	0,122	259,8	0,161	21,61	0,284
ABCC4	AG	1	13,3		2140,0		194,4		38,00	

*rs1800460 ve rs7142143 polimorfizmlerinde varyant allel olmadığı için tabloya alınmamıştır. Mann Whitney U testi; p<0,05

- Genel bilgilerde de bahsedildiği gibi aynı metabolik yolda yer alan genetik polimorfizmler bir araya geldiklerinde oluşan haplotipler, ilaç yan etkilerinin şiddetini arttırıp azaltabilmektedir. Bu nedenle 6-MP ve MTX metabolizma yollarında ortak yer alan genler ikili olarak eşleştirilmiştir (Şekil 2.5). Oluşan kombinasyonlar: *SLCO1B1-MTHFR*, *SLCO1B1-TPMT*, *TPMT-ITPA*, *TPMT-IMPDH2*, *TPMT-PACSIN2*, *TPMT-ABCC4*, *ITPA-IMPDH2* ve *ITPA-ABCC4* olarak oluşturulmuştur. Bu kombinasyonlara ait hastalarda görülen genotipler dört gruba ayrılmıştır:

- 1. Grup: birinci gen normal/ikinci gen normal genotip
- 2. Grup: birinci gen varyant/ikinci gen normal genotip
- 3. Grup: her iki gen de varyant genotip
- 4. Grup: birinci gen normal/ikinci gen varyant genotip

Dört grup arasında hastalar yaş, cinsiyet, risk grubu, tedavi alt kolu, 6-MP/MTX ilaç dozları, idame tedavisine ara verme süresi ve ilaç yan etkileri bakımından karşılaştırılmıştır; ancak gruplar arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

- En düşük dozda 6-MP kullanan hasta (44 numaralı) ortalama 6-MP: 20,8 mg/m²/gün ve MTX: 7,8 mg/m²/hafta almaktadır. Hastada 5 polimorfizm (rs1801131, rs4149056, rs11045879, rs7270101 ve rs2413739) heterozigot saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması çocuk ALL hastalarının idame tedavisinde tolere ettikleri 6-MP ve MTX dozlarındaki farklılıkları açıklamak için yapılmıştır. Bu amaçla, hastalarda 6-MP/MTX metabolizmasında yer alan 8 farklı gendeki 15 genetik polimorfizm analiz edilmiş; genotipler ile bu ilaçların klinik toleransı değerlendirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular birkaç açıdan önemlidir. Öncelikle, genetik polimorfizmlerin etnik gruplar arasındaki değişkenliği göz önünde bulundurulursa Türkiye’den çocuk ALL hastalarında tiyopürin metabolizması ile ilişkili 15 TNP analiz edildiği ilk çalışmadır. İkinci olarak, Türkiye’de *TPMT* varyant allel sıklığını Tümer ve ark. %2,7; Albayrak ve ark. %8,6 ve bizim çalışmamız %3,8 olarak hesaplamıştır (32, 33) (Tablo 4.12). Öte yandan çalışmamızdaki hastaların hepsinde tiyopürin yan etkileri sebebiyle tedaviye ara verilmiş veya ilaç dozu standart dozdan düşük tolere edilmiştir. Bu durum Türk hastalarda, *TPMT* varyantlarından başka polimorfizmlerin ilaç toleransında etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda daha düşük 6-MP/MTX dozu kullanan hastalarda *SLCO1B1* varyant alellerinin sık saptanmış olması önemlidir. Çünkü bu gendeki rs4149056 ve rs11045879 polimorfizmleri varyant allel sıklığı bizim çalışmamızdaki hastalarda da saptandığı gibi (sırasıyla %11 ve %8,7), özellikle *TPMT* varyantlarının nadir görüldüğü Asya toplumlarında yüksektir (sırasıyla %15-20 ve %38-45) (Tablo 2.5).

Çalışmaya alınan 48 çocuk ALL hastasının klinik özelliklerine bakıldığında literatür ile benzer bulgular saptanmıştır (14). Buna göre, erkeklerde ALL kızlara (erkek/kız:1,8) göre daha sık görülmektedir (Tablo 4.1). Lösemi başlangıcında en sık başvuru şikayeti ateş, halsizlik ve ekstremitte ağrısıdır. Fizik muayenede en sık saptanan bulgular solukluk, hepatosplenomegali ve LAP’dır. Mediasten tutulumu 3 hastada mevcuttur ve bu hastaların hepsi T-ALL’dir. Başvuruda anemi ve trombositopeni sık görülmektedir. Lökosit sayısı normal, düşük veya yüksek olan hastalar vardır (Tablo 4.2). Lösemi alt tiplerine bakıldığında öncül B-hücreli ALL’nin daha sık olduğu görülmüştür. Hastalar tanı anındaki yaş, lökosit sayısı, lösemi alt tipi ve sitogenetiğe göre risk gruplarına ayrılmıştır. Hastaların çoğunun

literatürdeki gibi standart risk grubunda olduğu görülmüştür (Tablo 4.3). Çok yüksek risk grubundaki iki hastada t(9;22) ve *MLL* gen yeni oluşumu vardır.

Çalışmaya başlarken idame tedavisinde görülen yan etkilere sebep olan ilaçlar değerlendirilmiş ve literatürde idame tedavisinin bel kemiğini oluşturan 6-MP, MTX üzerinde durulduğu görülmüştür (11). Her iki ilaç da kemik iliğini baskıladığı ve dozlar paralel ayarlandığı için çalışmaya birlikte dahil edilmiştir. Literatürde tolere edilen 6-MP/MTX dozları farklı şekillerde hesaplanabilmektedir. Suzuki ve ark. kümülatif ilaç dozunu (mg/m^2), 6-MP için gün cinsinden ve MTX için hafta olarak toplam idame tedavisi süresine bölmüşlerdir (47). Moriyama ve ark. en az 9 haftalık idame tedavisi sonrasında son 14 günün ortalamasını almışlardır (53). Bhatia ve ark. yaptıkları 298 çocuktan oluşan çok uluslu çalışmada ise, 6 ay boyunca aylık olarak kaydedilen dozlardan yola çıkarak ortalama dozu öngörmüşlerdir (54). Bizim çalışmamızdaki 48 hastanın 13'ünde tedavi halen sürdüğü için, ilk bir yıldaki 3 aylık periyodlar halinde kaydedilen dozların ortalaması alınmıştır.

Çalışmada çarpıcı olarak hiçbir hastanın protokolda önerilen tam dozda 6-MP ve MTX'ı tolere etmediği gösterilmiştir (Tablo 4.6). Bu durum, başka merkezlerde de gözlenmiştir. Ma ve ark., 133 çocuk ALL hastasının idame tedavisi sırasında tolere ettiği ortanca 6-MP dozlarını değerlendirmiştir (55). Buna göre; 72 hastanın (%54) Pekin Çocuk Hastanesi'nde kullanılan BCH-ALL-2003 protokolünde önerilen standart doz olan $46\text{mg}/\text{m}^2/\text{gün}$, geri kalan 61 vakanın (%46) ise $25\text{-}30\text{mg}/\text{m}^2/\text{gün}$ 'den 6-MP aldığını saptamıştır. İkinci grubun daha düşük dozda 6-MP tolere etmesi, kemik iliği ve karaciğer toksisitesine bağlanmıştır. Standart dozun, her zaman hastaların tolere ettiği maksimum doz olmadığını belirtmişlerdir (55).

St. Jude Üniversitesi'nden Yang ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada, COG protokolünün uygulandığı 657 ve 371 çocuk ALL hastasından oluşan iki kohort grupta 6-MP doz yoğunluğunu hesaplamıştır. 6-MP doz yoğunluğu, hastanın kullandığı dozun protokolda önerilen $75\text{mg}/\text{m}^2/\text{gün}$ 'e bölünmesi ile elde edilen yüzdendir. Hastalar farklı etnik gruplara ayrılmıştır. Buna göre hastaların çoğunda 6-MP doz yoğunluğunun %100'ün altında olduğu ve özellikle Doğu Asya kökenlilerin daha düşük dozu tolere edebildiği görülmüştür (56). Bhatia ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan çalışmaya; COG grubuna dahil olan 77 merkezdeki 298 çocuk ALL

hastası katılmıştır. Günlük 6-MP doz yoğunluğunun %75-%84 arasında değiştiği saptanmıştır (54).

Türkiye'den Albayrak ve ark., 58 Türk çocuk ALL hastasında *TPMT* polimorfizmleri ve 6-MP toleransını incelemiştir (33). Çalışmaya alınan hastalara ALL-BFM-95 protokolü uygulanmıştır. Bu protokole göre, idame tedavisi standart dozu 6-MP için 50mg/m²/gün ve MTX için 20mg/m²/hafta'dır. Bu çalışmada *TPMT* polimorfik varyantı olan hastaların idame tedavisinin ilk 24 haftasında kullandıkları günlük ortalama 6-MP dozu 31±14 mg/m² iken, normal varyanta sahip olanların 54±9 mg/m²'dir. Bu örnekler tiyopürin yanıtına etki eden faktörlerde ırksal farklılıklar olabileceğinin altını çizmektedir. Bizim çalışmamızda da idame tedavisinde kullanılan ortalama 6-MP günlük 39±10,6 mg/m² ve haftalık MTX 11,7±3,1 mg/m²' dir (Tablo 4.6). Doz yoğunluğu ise 6-MP için %28-92 ve MTX için %27-99 arasındadır (Şekil 4.1). Normal varyant *TPMT* polimorfizmine sahip olan 44 (%92) hastamızın da, standart dozları tolere edemediği saptanmıştır.

Yan etkiler sebebiyle idame tedavisine ara verilirken veya ilaç dozları azaltılırken hastaların yetersiz tedavi edilmemesi en önemli husustur. Son yıllarda tedavideki gelişmeler sayesinde lösemide 5 yıllık sağ kalım %90'ları bulmuştur (7). İdame tedavisi açısından başlangıç 6-MP ve MTX dozlarını tolere eden; ancak ilerleyen dönemde doz artışı yapılmayan hastalarda prognoz, lökopeni nedeniyle doz azaltılan veya hedef miyelosupresyon sağlanana kadar doz arttırılan hastalara göre daha kötü olduğu gösterilmiştir. Karaciğer enzimlerindeki artış nedeniyle tedaviye verilen aralar ise relaps açısından risk oluşturmaktadır. Öte yandan, miyelosupresyon ve enfeksiyonlar nedeniyle tedaviye ara verilme süresi ile relaps riski arasında bir ilişki gösterilememiştir (11). Bizim çalışmamızda ilaç dozları ayarlanırken hastaların belli bir lökopeni sınırında tutulduğu saptanmıştır. Hastaların idame tedavisi sırasındaki ortalama lökosit sayısı 3467/μL±1004'tür (ortanca:3322/μL, min:1920, max:7040; Tablo 4.7). Literatürdekine benzer olarak hastalarımızda idame tedavisi sırasında ilaç yan etkilerine bağlı olarak en sık enfeksiyon, karaciğer ve GİS yan etkileri gözlenmiştir (Tablo 4.8) (11). İdame tedavisine de en sık ara verilme sebebi ağır miyelosupresyon ve enfeksiyonlar (en sık febril nötropeni) olmuştur (Tablo 4.9). Metod bölümü 3.2.2. kısımda belirtildiği gibi, karaciğer enzimleri ciddi derecede yükselmediği sürece tedaviye ara verilmemiştir.

Bizim hastalarımızdaki tedavi başarısına bakıldığında 13 hastanın idame tedavisi sürmekle beraber tüm hastaların remisyonda izlendiği görülmektedir (Şekil 4.2). İlaçlar, hastaları belli bir lökopeni sınırında tutacak, ağır enfeksiyonlardan koruyacak maksimum dozlarda ayarlanmaya çalışılmıştır. Böylece tedavi başarısından ödün verilmemesi sağlanmıştır.

Farmakogenetik araştırma açısından ALL örnek hastalık modelidir. *TPMT* genotiplendirmesi, hastanın tedaviden göreceği faydayı kısıtlamadan, karşılaşılabilecek yan etkileri azaltacak 6-MP dozunun, tedavinin en başından ayarlanmasına yol göstermektedir. Ancak tiyopürin ilişkili miyelosupresyonu sadece *TPMT* geninde görülen varyasyonlarla açıklamak mümkün olmamaktadır; çünkü miyelosupresyon yaşayıp tedaviye ara verilen hastaların önemli bir kısmının *TPMT* mutasyonuna sahip olmadığı bilinmektedir (56). Benzer şekilde, bizim hastalarımızın çoğunda idame tedavisine yan etkiler sebebiyle ara verilmiş ve ilaç dozu azaltımına gidilmiştir; ancak sadece 4 hastada *TPMT* varyantı vardır (Tablo 4.13).

İlaç metabolizmasında yer alan enzimlerde görülen pek çok genetik polimorfizmin sıklıkları etnik gruplar arasında farklılık göstermektedir. *TPMT* aktivitesinin genetik temelleri insanlarda pek çok çalışma ile tanımlanmıştır. Buna göre *TPMT* geninde işlevsel olmayan protein oluşumuna sebep olan ve düşük *TPMT* aktivitesi ile ilişkili 3 mutasyon tanımlanmıştır (G238C, G460A ve A719G). Bu mutasyonlar 4 defektif alleli oluşturur: *TPMT**2 (G238C, rs1800462), *3A (G460A ve A719G), *3B (G460A, rs1800460) ve *3C (A719G, rs1142345). Beyaz ırkta *TPMT**3A en sık görülürken, Asya ırkından gelenlerde *TPMT**3C daha sık görülmektedir. *TPMT* polimorfizmlerine dair Türkiye'den iki çalışma bulunmaktadır. Tümer ve ark. çalışmasında, 106 çocuk ALL hastasında en sık görülen *TPMT* polimorfizmlerine PZR ile bakılmıştır (32). Hastaların %2,7'sinde varyant allel saptanmıştır. En sık olarak *TPMT**3A (%0,9) ve *TPMT**3C (%0,9) varyantı görülmüştür. Albayrak ve ark. çalışmasında 58 çocuk ALL hastasının *TPMT* polimorfizmlerine DNA mikroarray ile bakılmıştır. *TPMT* varyant allel sıklığı %8,6 olarak hesaplanmıştır. *TPMT**3A %3,4 ve *TPMT**3C %0,9 sıklıkta bulunmuştur. *TPMT**2 ve *3B her iki çalışmada da saptanmamıştır.

Bizim çalışmamızda Asya ırkında en sık saptanan varyant TPMT*3C sıklığı, hasta grubunda %5, sağlıklı grupta %1 olarak bulunmuştur ve hasta grubunda en sık görülen varyant alleldir (Tablo 4.12). Hasta grubunda varyant allel sıklığı %3,8'dir. Bir hastada TPMT*3C/*2 genotipi saptanmış olup bu hastanın 6-MP'ı 27mg/m²/gün ve MTX'ı 11mg/m²/hafta gibi çok düşük dozda tolere edebildiği saptanmıştır. Türkiye'deki diğer çalışmalardan farklı olarak TPMT*3A (TPMT*3B ve *3C'yi içeren haplotip) bulunmamaktadır. Diğer iki çalışmada tespit edilmeyen TPMT*2 ise hastalarda %2, kontrol grubunda %0,5 sıklıkta görülmektedir. TPMT*3A ve *3B varyantının tespit edilmemiş olmasının sebebi vaka sayısının azlığı ve diğer toplumlarda da allel sıklığının düşük olması olabilir (Tablo 2.5). Diğer genetik polimorfizmlerin sıklıkları hasta ve kontrol grubunun kendi içinde kıyaslanmış ve anlamlı fark saptanmamıştır.

Hardy-Weinberg dengesinin hasta grubunda iki polimorfizm için bozulduğu görülmüştür. Hardy-Weinberg kuralına göre eşeyli üreyen türlerin oluşturduğu popülasyonlarda koşullar sabit kaldığı sürece, hem allel frekansları hem de fenotip dölden döle sabit kalır. Bu kuralın uygulanabilmesi için (57):

- Populasyon, şansın tek başına allel genin frekansını değiştirme olasılığını yok edebilecek kadar büyük olmalı,
- Mutasyon olmamalı ya da mutasyonlar dönüşümlü olmalı,
- İç ve dış göçler olmamalı,
- Çiftleşme rastgele olmalı,
- Üreme başarısı farklı olmamalıdır.

HW dengesinin iki allelde bozulması; hasta sayısının az olması, göçler ve akraba evliliği (4 hastanın ailesinde mevcut) ile açıklanabilir.

Tezin diğer bir amacı hastaların genetik polimorfizmleri ile ilaç dozları ve yan etkileri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Sekiz farklı gendeki, 15 adet TNP'in genotiplendirmesi sonucu *SLCO1B1* genindeki rs4149056 polimorfizminden TC ve CC varyantı ile rs11045879 polimorfizminden TC ve CC varyantına sahip hastaların idame tedavisindeki 6-MP ve MTX'ı anlamlı olarak daha düşük dozda tolere ettikleri bulunmuştur (Tablo 4.14, Şekil 4.3 ve 4.4). Her iki polimorfizm arasında bağlantı

denge-sizliği olması nedeniyle hastalarda iki polimorfizmin varyant alleli, bir hasta hariç bir arada görölmektedir. Hastaların, *SLCO1B1* genindeki iki farklı bölgede yer alan polimorfizm açısından birleşik heterozigot olmaları *SLCO1B1* aktivitesini daha fazla etkilemiş ve ilaç toleransına yansımış olabilir. *SLCO1B1* geninde her iki polimorfizm de homozigot mutant olan bir hasta, 6-MP 31,7 mg/m²/gün ve MTX 9,4 mg/m²/hafta olarak kullanmaktadır. Homozigot varyant olmasına karşın bu hastanın, ilaçları en düşük dozda tolere eden hasta olmamasının birkaç sebebi olabilir. Öncelikle bu koşulu sağlayan sadece bir hasta vardır; daha fazla vaka olsa ilaç dozuna etkisi daha belirginleşebilir. İkinci olarak, hastada değeriendirmediğimiz başka genetik polimorfizmler koruyucu olarak etki etmiş olabilir. Üçüncü olarak hastalarımızın protokole göre düşük doz ilaç tolere etmesine etki eden başka polimorfizmler olması muhtemeldir. Yani tek bir TNP ile ilaç dozu arasında ilişki kurmak güçtür.

Asya ve Avrupa toplumlarında *SLCO1B1* genetik polimorfizmleri sık görölmektedir. *SLCO1B1* rs4149056 varyantının Asya'da %11-13 ve Avrupa'da %15 sıklıkta görüldüğü bilinmektedir (Tablo 2.5). Benzer şekilde rs11045879 varyantı, Asya'da %38-35 ve Avrupa'da %16 sıklıkta görölmektedir (Tablo 2.5). Bizim çalışmamızda hastalardaki *SLCO1B1* varyant allel sıklığı rs4149056 için %11, rs11045879 için %8,7 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunda (n=101) ise rs4149056 varyant sıklığı %11, rs11045879 sıklığı %17'dir. *SLCO1B1* varyantlarından rs4149056'nın Türkiye'de analiz edildiği tek çalışma vardır. Özhan ve ark.'nın, kolorektal kanser ile *SLCO1B1* polimorfizmlerinin ilişkisini incelediği vaka-kontrol çalışmasında rs4149056 varyant sıklığı hastalarda (n=100) %13 ve kontrol grubunda (n=150) %22 saptanmıştır (58). Bizim olgularımızla benzer sıklıkta olduğu görölmektedir.

SLCO1B1 dışındaki genlerde bakılan 13 polimorfizm ile ilaç dozları arasında ilişki gösterilememiştir (Tablo 4.14). Bunun birkaç sebebi olabilir. Öncelikle hastalarımızın düşük dozları tolere ettikleri bilindiğinden, önerilen 75mg/m²/gün'den daha az bir doz ile tedaviye başlanması ve hastalar tolere edemediği için kolaylıkla arttırılamamasıdır. Diğer bir neden, yakın aralıklarla yapılan hasta izlemi sayesinde ilaç dozlarının hastalarda ağır toksisite oluşmasını engelleyecek şekilde erkenden düzenlenmesidir. Buna karşın, tiyopürine bağlı mielosupresyona sebep olan *TPMT*

geni rs1800462 varyantına sahip hastalarda ilaç yan etkisi sebebiyle tedaviye daha uzun süre ara verildiği gösterilmiştir (Tablo 4.15); ancak yan etki görülme sıklığı ile bir ilişki saptanmamıştır.

Farklı bir bulgu olarak, cinsiyetler arası idame tedavisi yan etki ve ara verme sıklığı arasında kızlar lehine fark bulunmaktadır. Erkeklerde idame tedavisine daha sık ara verilmiş ve febril nötropeni daha sık saptanmıştır (Tablo 4.10 ve 4.11). Bu durum idame tedavisinin erkeklerde daha uzun sürmesi ile ilişkili olabilir. Ayrıca ilaç metabolizmasına etki eden cinsiyete ilişkin özellikler ve bakılamayan diğer faktörlerdeki çeşitlilik de sebep olabilir. Öte yandan genetik polimorfizmler ile ilaç yan etkileri arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bu durum tıpkı ilaç dozlarında olduğu gibi, ağır yan etki oluşmayacak şekilde hasta özelinde ilaç dozlarının ayarlandığını desteklemektedir.

İlaç yan etkilerinin ortaya çıkmasında tek bir TNP'den çok farklı TNP'lerdeki etkilerin birleşik etkisi söz konusudur. Arenas ve ark. çalışmasında *MTHFR* mutasyonunun *TPMT* aktivitesini etkilediği, özellikle *TPMT* varyantı ile bir aradaysa tiyopürin ilişkili toksisiteye sebep olacağı öne sürülmüştür (38). Kuzelicki ve ark. da *TPMT* varyantları *MTHFR* varyantı ile bir arada ise tiyopürin ilişkili toksisitenin artacağını saptamıştır (46). Benzer olarak Stocco ve ark. çalışmasında *TPMT* ve *ITPA* aynı yolakta yer aldığı için, *TPMT* normal, *ITPA* varyanta sahip olan hastalardaki metilli metabolitlerin en çok arttığı ve hepatotoksisiteye sebep olacağı düşünülmüştür (35). Bizim çalışmamızdaki hastalardan en düşük dozda 6-MP kullanan hasta (44 numaralı) ortalama 6-MP: 20,8 mg/m²/gün ve MTX: 7,8 mg/m²/hafta almakta; hastada 5 polimorfizm (rs1801131, rs4149056, rs11045879, rs7270101 ve rs2413739) heterozigot saptanmıştır. Öte yandan aynı ilaç metabolizmasında yer alan genlerin ikili kombinasyonlarındaki genotipler ile ilaç dozları ve yan etkileri kıyaslandığı zaman, bir ilişki saptanamamıştır (bulgular kısmı bölüm 4.5).

Bu bilgiler ışığında, *SLCO1B1* varyantına sahip bireylerde anlamlı sonuç elde edilmesi değerli bir bulgu olarak kabul edilebilir. *SLCO1B1* hepatositlerin sinüzoidal membranında eksprese olan, 692 aminoasitten oluşan bir proteindir. Safra asitleri, steroidler, eikozanoidler ve tiroid hormonları endojen substratlarındandır. Statinler,

anjiyotensin reseptör antagonistleri ve metotreksat gibi pek çok ilacın kandan hepatositlere taşıyıp safra yoluyla atılmasını sağlar (59). SLCO1B1, MTX'in hücreye girişinde rol alan bir protein iken, bu varyanta sahip hastalarda 6-MP dozlarının da düşük olmasının farklı sebepleri olabilir. Öncelikle 6-MP ve MTX beraber kullanılmakta ve her ikisi de miyelosupresyon ve hepatotoksisiteye sebep olduğu için, ilaç toksisitesi gözlemlendiği zaman dönüşümlü olarak doz azaltılmaktadır. Bunun yanı sıra, 6-MP ve MTX metabolizmasında ortak yollar bulunmaktadır.

6-MP ve MTX ilaçlarının etkileşimi farmakokinetik veya farmakodinamik olabilir. 6-MP'nin karaciğerde ilk geçiş etkisinden sorumlu XO enzimi, MTX tarafından engellenmektedir. Dolayısıyla iki ilaç bir arada kullanılırsa 6-MP konsantrasyonu artar; ancak bu etki daha çok, yüksek doz MTX ile kullanılırsa belirginleşmektedir. Farmakodinamik olarak bakıldığında, her iki ilaç da malign lenfoblastlarda çok aktif olan *de novo* pürin sentezini inhibe etmektedir. Bu yoldan pürin sentezleyemeyen hücreler pürin kurtarma yolağına yönelir. Ancak 6-MP hipoksantin analogu olduğu için endojen pürin bazları ile yarışır ve DNA-RNA'ya eklenmeyi başarır. MTX da *de novo* pürin sentezini engelleyerek pürin kurtarma yolu ile 6-MP'nin nükleik asitlere eklenmesine katkıda bulunur. Ayrıca bu iki ilaç birlikte apoptozu da indüklemektedir. MTX ve 6-MP arasındaki biyokimyasal sinerjistik etkileşim, dozların paralel olarak etkilenmesine sebep olabilir (17).

MTX atılımının uzun sürmesi, 6-MP yan etkisini arttırmış olabilir. Konsolidasyon tedavisinde MTX yüksek doz verilirken, hastalarda gözlenen farklı toksisiteler sebebiyle yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmalarında *SLCO1B1* polimorfizmi fark edilmiştir (39). İdame tedavisindeki 6-MP/MTX dozu ile *SLCO1B1* ilişkisinin araştırıldığı literatürde tek bir çalışma bulunmaktadır. Suzuki ve ark., 2015 yılında yayınladıkları çalışmaya 53 çocuk ALL hastasını dahil etmiştir. Taqman PZR yöntemi ile *TPMT*, *IIPA*, *MRP4 (ABCC4)*, *MTHFR*, *RFC1* (reduced folate carrier 1) ve *SLCO1B1* genlerinde yer alan 8 polimorfizm değerlendirilmiştir. Tokyo Çocuk Kanser Çalışma Grubu (TCCSG) önerisine göre hastalar idame tedavisinde günlük 40mg/m² 6-MP ve haftalık 25mg/m² MTX almaktadır. İlaç dozu lökosit sayısı ve karaciğer fonksiyon testlerine göre ayarlanmıştır. *SLCO1B1* genindeki rs4149056 polimorfizminde TC veya CC varyantına sahip hastaların 25mg/m²/gün'den 6-MP kullandıkları görülmüştür. *SLCO1B1* genindeki rs11045879

polimorfizmi de değerlendirmeye alınmış; ancak klinik özellikler ve ilaç dozları ile bir ilişki saptanmamıştır. MTX dozunun ise polimorfizmler ile ilişkisi gösterilememiştir. Bu bulgu üzerine 102 hastalık 6-MP ve *SLCO1B1* polimorfizminin ilişkisinin araştırılacağı yeni prospektif bir çalışma planlanmıştır (47). 6-MP metabolizmasında *SLCO1B1* rolü, ileri çalışmalar ile incelenebilir. Bizim çalışmamızda ek olarak *SLCO1B1*'deki hem rs4149056, hem de rs11045879 varyantları ile her iki ilaç dozu arasında ilişki saptanmıştır. İleride daha geniş serilerde *SLCO1B1*'in idame tedavisindeki rolü araştırılabilir.

Tez çalışmamızda saptanan bulgular ışığında, lösemi idame tedavisindeki standart dozu tolere edemeyen ve ağır yan etkilerle karşılaşan hastalarda bu durumu çoğunlukla, *TPMT* polimorfizmleri ile açıklayamamaktayız. Bu nedenle bu tür hastalarda sık görülen diğer polimorfizmlerin, *SLCO1B1* gibi, etkili olduğu akla gelmelidir. Klinikte sık karşılaşılan bir durum olması sebebiyle ve henüz rutin olarak *TPMT* dışında başka genlerdeki polimorfizmler incelenmediği için, hastalara idame tedavisine standart dozdan daha düşük 6-MP ve MTX ile başlanabilir. MTX'in 6-MP etkisini arttırıcı özelliği sebebiyle; hastalara 6-MP'nin akşam alınması tavsiye edilirken, MTX'in sabah saatlerinde verilmesi önerilebilir. Miyelosupresyon nedeniyle 6-MP dozunun azaltılması gerektiğinde, önce aralarındaki sinerjistik etki sebebiyle, MTX'in alındığı gün 6-MP atlanabilir. Bu etkili olmazsa, diğer günlerdeki 6-MP azaltılabilir. 6-MP/MTX konsantrasyonunu arttıran ilaçlar gerekli halde, dikkatle kullanılmalıdır.

Geniş vaka sayısına sahip serilerde, *SLCO1B1*'in idame tedavisindeki 6-MP ve MTX toleransına etkisi tekrar çalışılabilir. Tezimizde ve Suzuki ve ark. çalışmasında saptanan bulgular tekrar üretilirse, idame tedavisini zor tolere eden seçilmiş hastalarda *SLCO1B1* polimorfizmleri genotiplendirilebilir. *SLCO1B1*'in MTX metabolizması ile ilişkisi bilindiğinden, *SLCO1B1* varyantı olanlarda doz azaltımı yapılacağı zaman, öncelikle MTX'in azaltılması tercih edilebilir.

Kanser tedavisinde ve immünsüpresif olarak yaygın kullanılan tiyopürinlerin metabolizmasına etki eden yeni polimorfizmler tanımlanmaktadır. Bu bağlamda Moriyama ve ark. Asya kökenli 270 çocuk ALL hastasında yaptıkları çalışma ile önemi yeni keşfedilen bir polimorfizm olan *NUDT15*'in tiyopürin metabolizması ile

ilişkini aydınlatmıştır. Avrupalı toplumlardaki *TPMT* polimorfizminin Asya toplumlarındaki karşılığı olarak düşünülen *NUDT15*'teki düşük aktivite, tiyopürin aktif metabolitlerini arttırıp toksisiteye sebep olmaktadır (53). Biz de hastalarımızın ilaç dozlarındaki farklılıkları daha iyi açıklayabilmek için *NUDT15* varyantlarının çalışılmasını planladık.



6. SONUÇLAR

Çocuklar ve ALL üzerine yapılan farmakogenetik araştırmalar; genom boyu ilişkilendirme çalışmalarında saptanan aday genlerin, ilaç yan etkisindeki rolünün değerlendirilmesine dayanmaktadır. Aday genler ve ilaç yan etkisi arasındaki ilişkinin doğruluğunu kanıtlamak için, başka gruplarda da geçerliliği gösterilmelidir. Sunulan bu tez, 6-MP/MTX metabolizmasında yer alan 8 farklı gendeki, 15 tek nükleotit polimorfizmin ocuk ALL hastalarında klinik özellikleri ile ilişkilendirildiği Türkiye’den *ilk çalışmadır*.

Tez çalışmasında, klinikte sık karşımıza çıkan idame tedavisindeki ilaç intoleransı ve yan etkilerinin genetik temelleri araştırılmıştır. Çok sayıda polimorfizmin genotiplendirmesi için KASP uygun ve maliyet etkin bir yöntem olmuştur. Genotipler ile hastaların tolere ettikleri ortalama 6-MP/MTX dozları analiz edildiğinde, *SLCO1B1* geninde rs4149056 ve/veya rs11045879 kodlu polimorfizmlere sahip hastaların protokolda önerilenden daha düşük dozlar kullanabildiği saptanmıştır. Bu bulguyla, ocuklarda ALL idame tedavisindeki 6-MP ve MTX dozları ile *SLCO1B1* polimorfizmleri arasındaki ilişkinin gösterildiği *literatürdeki ilk çalışma olmuştur*.

Çalışmaya alınan 48 ocuk ALL hastasının lösemi tanısı almadan önce en sık başvuru yakınması ateş, halsizlik ve ekstremite ağrısı; hastalarda en sık saptanan bulgular anemi, hepatosplenomegali ve lenfadenopatidir. Hastaların çoğunu ncl B-hücreli ALL ve standart risk grubu oluşturmaktadır. Çalışmadaki hastaların idame tedavisine başlarken ortanca yaşı 6 (1-18) ve lösemi tanısından idame tedavisine başlayana kadar geçen süre ortanca 12 (5-17) aydır.

Bu araştırmadan elde edilen bilgileri, çalışmanın amaçları doğrultusunda maddeler halinde sıralarsak:

- 1) Hastaların tamamı idame tedavisinde protokolda önerilen standart dozlardan 6-MP için $75 \text{ mg/m}^2/\text{gün}$ yerine ortalama $39 \text{ mg/m}^2/\text{gün}$ ($\pm 10,6$) ve MTX için $20 \text{ mg/m}^2/\text{hafta}$ yerine ortalama $11,7 \text{ mg/m}^2/\text{hafta}$ ($\pm 3,1$) olarak kullanılmaktadır. Hastaların iki ilacı protokole göre önerilenden daha düşük dozda tolere etmesinin sebebi sık karşılaşılan ilaca bağlı yan

etkilidir. Yedi hasta haricindeki tüm hastalara sıklık sırasına göre kemik iliği baskılanması, enfeksiyonlar ve hepatotoksisite nedeniyle idame tedavisine ara verilmiş ve/veya doz azaltılmıştır. Gastrointestinal sistem yan etkileri ara vermeye sebep olmamıştır.

- 2) Klinik rehberlerde 6-MP bağlı ağır yan etkilere yol açması sebebiyle hastalarda önceden doz ayarlaması önerilen *TPMT* polimorfizmleri, hastalarımızın sadece 4'ünde saptanmıştır. **Bu çalışma, *TPMT* polimorfizmlerinin düşük ilaç toleransını açıklamakta yetersiz kaldığını göstermektedir.**
- 3) *TPMT* genindeki fonksiyonel olmayan *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B* ve *TPMT*3C* alellerinden Türkiye'deki diğer iki pediatrik ALL çalışmasında en sık *TPMT*3A* ve *TPMT*3C* varyantları saptanırken, *TPMT*2* varyantı görülmemiştir. Bizim çalışmamızda en sık varyant *TPMT*3C* iken, farklı olarak *TPMT*3A*'ya rastlanmamış ve *TPMT*2* varyantı %2 sıklıkta tespit edilmiştir.
- 4) Bu çalışmada, bazı ilaçlar ve endojen maddelerin vücuttan atılımında rol alan hepatosit membranındaki taşıyıcı bir proteini kodlayan *SLCO1B1* geni ile idame tedavisinde tolere edilen 6-MP/MTX dozları arasında ilişki gösterilmiştir. Çalışmada yer alan *SLCO1B1* dışındaki genler ile; idame tedavisi sırasında kullanılan ortalama 6-MP ve MTX dozları, hastalarda gözlenen kemik iliği baskılanması, enfeksiyonlar, karaciğer ve GİS yan etkileri arasında bir ilişki saptanmamıştır.
- 5) 6-MP/MTX metabolizmasında ortak rol alan sekiz gene ait 15 genetik polimorfizmden sadece 2 tanesinin (*SLCO1B1* geni rs4149056 ve rs11045879) ilaç dozlarını etkilediği gösterilmiştir. Bu genler ilaç metabolizmasında ortak rol aldığı için bir arada değerlendirildiğinde ilaç intoleransında daha fazla etkili olabileceği düşünülmüştür. Bu bağlamda seçilen ikili gen kombinasyonlarının hastalardaki genotipleri; ilaç dozları ve yan etkiler açısından analiz edilmiştir. Ancak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

6) Hastalar protokolde önerilene göre düşük dozda 6-MP/MTX kullanmış ve hastalarda ilaç yan etkileri nedeniyle idame tedavisine zaman zaman ara verilmiştir. Buna karşın, tedavi başarısının etkilenmediği görülmektedir. Çalışmaya alınan hastaların %73'ü tedavisi bitmiş ve hastaliksız olarak ortanca 24 aydır (2-80 ay), %27'si idame tedavisi altında remisyonda izlenmektedir.

Tez çalışmasında elde edilen bilgiler ışığında şu önerilerde bulunabiliriz:

- 1) ALL idame tedavisinde, protokoldeki standart dozu tolere edemeyen hastalarla klinikte sık karşılaşılmaktadır. *TPMT* varyantları ilaç yan etkileri görülen hastaların çok az bir kısmını açıklamaktadır. Bu nedenle bu tür hastalarda sık görülen diğer polimorfizmlerin, *SLCO1B1* gibi, etkili olduğu akla gelmelidir.
- 2) Hastalarda *SLCO1B1* genindeki polimorfizmler dışında diğer çalışılan genetik polimorfizmler ile ilaç intoleransı arasında ilişki gösterilememiştir. Bu durum klinikte gözlenen ilaç yan etkilerine bağlı olarak dozların erken dönemde dikkatlice ayarlanması ile açıklanmıştır. Ayrıca ilaç yanıtındaki farklılıklara tek bir polimorfizmden ziyade genetik polimorfizmlerin birleşik etkisinin söz konusu olduğu unutulmamalıdır.
- 3) 6-MP/MTX dozlarının kişilere özel ayarlanması için çalışmamızda gösterilen *SLCO1B1* polimorfizmleri önemli bir genetik belirteç olabilir. İdame tedavisindeki düşük ilaç toleransı ile *SLCO1B1* varyantlarının ilişkisi daha geniş seriler ile tekrar değerlendirilebilir.
- 4) *SLCO1B1*; MTX gibi bazı ilaçlar ve endojen maddelerin vücuttan atılımında rol alan, hepatosit membranında bulunan taşıyıcı bir proteindir. *SLCO1B1*'in MTX'in atılımındaki rolü bilinmekten, tiyopürin metabolizması ile direk ilişkisi gösterilmemiştir. Bu bağlamda, *SLCO1B1*'in 6-MP metabolizmasındaki olası rolü fonksiyonel olarak araştırılabilir.

- 5) Klinikte sık karşılaşılan bir durum olması sebebiyle ve henüz rutin olarak *TPMT* dışında başka genlerdeki polimorfizmlere bakılmadığı için, idame tedavisine protokoldeki standart dozdan daha düşük, hastaların tolere ederken yetersiz tedavi edilmeyeceği 6-MP ve MTX dozları ile başlanabilir.
- 6) MTX'in 6-MP etkisini arttırıcı özelliği sebebiyle; hastalara 6-MP'nin akşam alınması tavsiye edilirken, MTX'in sabah saatlerinde verilmesi önerilebilir. Miyelosupresyon nedeniyle 6-MP dozunun azaltılması gerektiğinde de, önce MTX'in alındığı gün 6-MP atlanabileceği; bu etkili olmazsa, diğer günlerdeki 6-MP azaltılabileceği, şeklinde önerilebilir. 6-MP/MTX konsantrasyonunu arttıran ilaçlar (non-steroid antiinflatuar ilaçlar, proton pompa inhibitörleri, trimetoprim-sulfametoksazol gibi) gerekli halde, dikkatle kullanılmalıdır.
- 7) *TPMT* varyant sıklığının düşük bulunduğu toplumlarda daha sık görülen ve önemi yeni keşfedilen *NUDT15* varyantlarının, ilaç dozlarını etkilediği bir çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmanın devamında biz de benzer olarak hastalarımızda, *NUDT15* varyantlarının bakılmasını planladık.

ÖZET

ÇOCUKLUK ÇAĞI ALL HASTALARININ İDAME TEDAVİSİNDE KULLANILAN MERKAPTOPÜRİN FARMAKOGENETİĞİ VE İLAÇ DOZLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ

Akut lenfoblastik lösemi çocukluk çağının en sık malignitesidir. Başarılı bir idame tedavisi ile remisyonun sürdürülmesi, 6-merkaptopürin (6-MP) ve metotreksat (MTX) ilaçlarının uygun dozlarda kullanılmasına bağlıdır. Ancak bu ilaçlar ciddi kemik iliği baskılanması yapıp ağır enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Klinik uygulamada bunu önlemek için zaman zaman tedaviye ara verilmekte ve doz azaltımına gidilmektedir. Bu ilaçların hastalarda gösterdikleri yan etkilere sık rastlanmakta; ancak sadece bir kısmı *TPMT* genetik polimorfizmleriyle açıklanmaktadır. Yapılan çalışmalar farklı etnik gruplarda, başka polimorfizmlerin etkili olduğunu göstermiştir. Çalışmaya alınan 48 tane çocuk ALL hastasının idame tedavisi sırasında tolere ettikleri 6-MP/MTX dozlarının, standart protokollerde önerilen 6-MP için 75 mg/m²/gün ve MTX için 20 mg/m²/hafta'dan düşük olduğu görülmüştür. Hastaların kullandıkları ortalama 6-MP: 37,8 mg/m²/gün ve MTX: 11,3 mg/m²/hafta'dır. Bunu açıklamaya yönelik 6-MP/MTX metabolizmasında yer alan 8 adet gende; *TPMT*, *ITPA*, *MTHFR*, *IMPDH2*, *PACIN2*, *SLCO1B1*, *ABCC4* ve *PYGL*, toplam 15 tek nükleotid polimorfizm KASP yöntemi ile genotiplendirilmiştir. *SLCO1B1* genindeki rs4149056 ve rs11045879 polimorfizmlerinde en az bir varyant allele sahip hastaların normal genotipe sahip olanlara göre daha düşük dozda 6-MP ve MTX kullandıkları saptanmıştır. Diğer analiz edilen polimorfizmler, 6-MP/MTX dozları ve yan etkileri ile ilişkili bulunmamıştır. Sonuç olarak, idame tedavisi 6-MP/MTX dozlarının hasta özelinde ayarlanması için *SLCO1B1* polimorfizmleri önemli bir genetik belirteç olabilir.

Anahtar Sözcükler: Çocukluk çağı, lösemi, merkaptopürin, metotreksat, polimorfizm, *SLCO1B1*

SUMMARY

THE ASSOCIATION OF DRUG DOSAGES DURING CHILDHOOD ALL MAINTENANCE THERAPY AND MERCAPTOPURINE PHARMACOGENETICS

Acute lymphoblastic leukemia is the most common malignancy of childhood. Successful maintenance therapy that prolongs remission, depends on usage of 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX) drugs at proper doses. However, these drugs may cause severe myelosuppression and lead to life threatening infections. In order to prevent such toxicities, the therapy can be discontinued and drug doses are reduced during clinical practice. Although the side effects due to these drugs are common, only few can be explained by *TPMT* genetic polymorphisms. It has been shown by previous studies that, other polymorphisms can be effective in different ethnic groups. In 48 pediatric ALL patients enrolled in this study, the tolerated 6-MP/MTX doses are lower than the scheduled doses for 6-MP: 75 mg/m²/day and for MTX: 20 mg/m²/week. It has been observed that the patients used 6-MP: 37,8 mg/m²/day and MTX: 11,3 mg/m²/week on average. In order to explain this, 15 single nucleotide polymorphisms in 8 candidate genes; *TPMT*, *ITPA*, *MTHFR*, *IMPDH2*, *PACSIN2*, *SLCO1B1*, *ABCC4* and *PYGL*, which have a role in the 6-MP/MTX metabolism were genotyped by KASP. The average dose of 6-MP and MTX were lower in patients who have at least one variant allele in rs4149056 and rs11045879 polymorphisms of *SLCO1B1* gene than in the patients with wild genotype. The other analyzed genetic polymorphisms were not associated with 6-MP/MTX doses or adverse effects. In conclusion, *SLCO1B1* rs4149056 and rs11045879 polymorphisms can be important genetic markers to individualize 6-MP/MTX maintenance therapy.

Key words: Childhood, leukemia, mercaptopurine, methotrexate, polymorphism, *SLCO1B1*

KAYNAKLAR

1. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*. 2012;120(6):1165-74.
2. Lehmann H, Ryan E. The familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet*. 1956;271(6934):124.
3. Meisel C, Gerloff T, Kirchheiner J, Mrozikiewicz PM, Niewinski P, Brockmoller J, Roots I. Implications of pharmacogenetics for individualizing drug treatment and for study design. *J Mol Med (Berl)*. 2003;81(3):154-67.
4. Elie V, de Beaumais T, Fakhoury M, Jacqz-Aigrain E. Pharmacogenetics and individualized therapy in children: immunosuppressants, antidepressants, anticancer and anti-inflammatory drugs. *Pharmacogenomics*. 2011;12(6):827-43.
5. Shah RR, Shah DR. Personalized medicine: is it a pharmacogenetic mirage? *Br J Clin Pharmacol*. 2012;74(4):698-721.
6. Lanzkowsky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. 5 ed. London: Elsevier; 2011.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(1):7-30.
8. Gültekin M, Boztaş G. *Türkiye Kanser İstatistikleri*. Ankara: T.C Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2015.
9. Kliegman R, Stanton B, Geme JS, Schor N. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 20 ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.
10. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013;381(9881):1943-55.

11. Schmiegelow K, Nielsen SN, Frandsen TL, Nersting J. Mercaptopurine/Methotrexate maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical facts and fiction. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2014;36(7):503-17.
12. Celkan T. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi. *Klinik Gelişim.* 2011;20(2):14-25.
13. Orkin SH, Fisher DH, Ginsburg D, Look AT, Lux SE, Nathan DG. Nathan and Oski's Hematology and Oncology of Infancy and Childhood. 8 ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. p. 1527-54.
14. Pizzo PA, Poplack DG. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 6 ed: Wolters Kluwer; 2011.
15. Alexander S. Clinically defining and managing high-risk pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2014;2014(1):181-9.
16. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, Carroll AJ, Heerema NA, Rubnitz JE, Loh ML, Raetz EA, Winick NJ, Hunger SP, Carroll WL, Gaynon PS, Camitta BM. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood.* 2007;109(3):926-35.
17. Giverhaug T, Loennechen T, Aarbakke J. The interaction of 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX). *Gen Pharmacol.* 1999;33(4):341-6.
18. Adam de Beaumais T, Jacqz-Aigrain E. Pharmacogenetic determinants of mercaptopurine disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012;68(9):1233-42.
19. Kodidela S, Suresh Chandra P, Dubashi B. Pharmacogenetics of methotrexate in acute lymphoblastic leukaemia: why still at the bench level? *Eur J Clin Pharmacol.* 2014;70(3):253-60.

20. Chen Y, Shen Z. Gene polymorphisms in the folate metabolism and their association with MTX-related adverse events in the treatment of ALL. *Tumour Biol.* 2015;36(7):4913-21.
21. Arico M, Baruchel A, Bertrand Y, Biondi A, Conter V, Eden T, Gardner H, Gaynon P, Horibe K, Hunger SP, Janka-Schaub G, Masera G, Nachman J, Pieters R, Schrappe M, Schmiegelow K, Valsecchi MG, Pui CH. The seventh international childhood acute lymphoblastic leukemia workshop report: Palermo, Italy, January 29--30, 2005. *Leukemia.* 2005;19(7):1145-52.
22. Yende S, Kammerer CM, Angus DC. Genetics and proteomics: deciphering gene association studies in critical illness. *Crit Care.* 2006;10(4):227.
23. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest.* 2008;118(5):1590-605.
24. Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol.* 2003;5(2):43-60.
25. Gupta PK, Rustgi S, Mir RR. Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity (Edinb).* 2008;101(1):5-18.
26. de Wildt SN, Tibboel D, Leeder JS. Drug metabolism for the paediatrician. *Arch Dis Child.* 2014;99(12):1137-42.
27. Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, Bilbao-Aldaiturriaga N, Pombar-Gomez M, Martin-Guerrero I, Garcia-Orad A. Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics.* 2014;15(10):1383-98.
28. Lennard L, Lewis IJ, Michelagnoli M, Lilleyman JS. Thiopurine methyltransferase deficiency in childhood lymphoblastic leukaemia: 6-mercaptopurine dosage strategies. *Med Pediatr Oncol.* 1997;29(4):252-5.
29. Relling MV, Hancock ML, Boyett JM, Pui CH, Evans WE. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1999;93(9):2817-23.

30. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, Hicks JK, Schwab M, Klein TE, Clinical Pharmacogenetics Implementation C. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;93(4):324-5.
31. Lennard L, Chew TS, Lilleyman JS. Human thiopurine methyltransferase activity varies with red blood cell age. *Br J Clin Pharmacol.* 2001;52(5):539-46.
32. Tumer TB, Ulusoy G, Adali O, Sahin G, Gozdasoglu S, Arinc E. The low frequency of defective TPMT alleles in Turkish population: a study on pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol.* 2007;82(10):906-10.
33. Albayrak M, Konysova U, Kaya Z, Gursel T, Guntekin S, Percin EF, Kocak U. Thiopurine methyltransferase polymorphisms and mercaptopurine tolerance in Turkish children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(5):1155-9.
34. Belen BF, Gursel T, Akyurek N, Albayrak M, Kaya Z, Kocak U. Severe Myelotoxicity Associated with Thiopurine S-Methyltransferase*3A/*3C Polymorphisms in a Patient with Pediatric Leukemia and the Effect of Steroid Therapy. *Turk J Haematol.* 2014;31(4):276-85.
35. Stocco G, Cheok MH, Crews KR, Dervieux T, French D, Pei D, Yang W, Cheng C, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphism of inosine triphosphate pyrophosphatase is a determinant of mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85(2):164-72.
36. Adam de Beaumais T, Fakhoury M, Medard Y, Azougagh S, Zhang D, Yakouben K, Jacqz-Aigrain E. Determinants of mercaptopurine toxicity in paediatric acute lymphoblastic leukemia maintenance therapy. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;71(4):575-84.

37. D'Angelo V, Ramaglia M, Iannotta A, Crisci S, Indolfi P, Francese M, Affinita MC, Pecoraro G, Napolitano A, Fusco C, Oreste M, Indolfi C, Casale F. Methotrexate toxicity and efficacy during the consolidation phase in paediatric acute lymphoblastic leukaemia and MTHFR polymorphisms as pharmacogenetic determinants. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(5):1339-46.
38. Arenas M, Simpson G, Lewis CM, Shobowale-Bakre el M, Escuredo E, Fairbanks LD, Duley JA, Ansari A, Sanderson JD, Marinaki AM. Genetic variation in the MTHFR gene influences thiopurine methyltransferase activity. *Clin Chem.* 2005;51(12):2371-4.
39. Ramsey LB, Panetta JC, Smith C, Yang W, Fan Y, Winick NJ, Martin PL, Cheng C, Devidas M, Pui CH, Evans WE, Hunger SP, Loh M, Relling MV. Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLCO1B1. *Blood.* 2013;121(6):898-904.
40. Radtke S, Zolk O, Renner B, Paulides M, Zimmermann M, Moricke A, Stanulla M, Schrappe M, Langer T. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2013;121(26):5145-53.
41. Haglund S, Taipalensuu J, Peterson C, Almer S. IMPDH activity in thiopurine-treated patients with inflammatory bowel disease - relation to TPMT activity and metabolite concentrations. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;65(1):69-77.
42. Brouwer C, Vermunt-de Koning DG, Trueworthy RC, Ter Riet PG, Duley JA, Trijbels FJ, Hoogerbrugge PM, Bokkerink JP, van Wering ER, De Abreu RA. Monitoring of inosine monophosphate dehydrogenase activity in mononuclear cells of children with acute lymphoblastic leukemia: enzymological and clinical aspects. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;46(4):434-8.
43. Stocco G, Yang W, Crews KR, Thierfelder WE, Decorti G, Londero M, Franca R, Rabusin M, Valsecchi MG, Pei D, Cheng C, Paugh SW, Ramsey LB, Diouf B, McCorkle JR, Jones TS, Pui CH, Relling MV, Evans WE. PACSIN2

polymorphism influences TPMT activity and mercaptopurine-related gastrointestinal toxicity. *Human molecular genetics*. 2012;21(21):4793-804.

44. Yang JJ, Cheng C, Devidas M, Cao X, Campana D, Yang W, Fan Y, Neale G, Cox N, Scheet P, Borowitz MJ, Winick NJ, Martin PL, Bowman WP, Camitta B, Reaman GH, Carroll WL, Willman CL, Hunger SP, Evans WE, Pui CH, Loh M, Relling MV. Genome-wide association study identifies germline polymorphisms associated with relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012;120(20):4197-204.
45. Krishnamurthy P, Schwab M, Takenaka K, Nachagari D, Morgan J, Leslie M, Du W, Boyd K, Cheok M, Nakauchi H, Marzolini C, Kim RB, Poonkuzhali B, Schuetz E, Evans W, Relling M, Schuetz JD. Transporter-mediated protection against thiopurine-induced hematopoietic toxicity. *Cancer Res*. 2008;68(13):4983-9.
46. Karas-Kuzelicki N, Jazbec J, Milek M, Mlinaric-Rascan I. Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia*. 2009;23(5):971-4.
47. Suzuki R, Fukushima H, Noguchi E, Tsuchida M, Kiyokawa N, Koike K, Ma E, Takahashi H, Kobayashi C, Nakajima-Yamaguchi R, Sakai A, Saito M, Iwabuchi A, Kato K, Nakao T, Yoshimi A, Sumazaki R, Fukushima T. Influence of SLC01B1 polymorphism on maintenance therapy for childhood leukemia. *Pediatr Int*. 2015;57(4):572-7.
48. Grinyo J, Vanrenterghem Y, Nashan B, Vincenti F, Ekberg H, Lindpaintner K, Rashford M, Nasmyth-Miller C, Voulgari A, Spleiss O, Truman M, Essioux L. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2008;21(9):879-91.
49. Hunger SP, Loh ML, Whitlock JA, Winick NJ, Carroll WL, Devidas M, Raetz EA. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(6):957-63.

50. Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding*. 2014;33(1):1-14.
51. Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res*. 2005;15(2):97-8.
52. Panoutsopoulou K, Tachmazidou I, Zeggini E. In search of low-frequency and rare variants affecting complex traits. *Human molecular genetics*. 2013;22(R1):R16-21.
53. Moriyama T, Nishii R, Perez-Andreu V, Yang W, Klussmann FA, Zhao X, Lin TN, Hoshitsuki K, Nersting J, Kihira K, Hofmann U, Komada Y, Kato M, McCorkle R, Li L, Koh K, Najera CR, Kham SK, Isobe T, Chen Z, Chiew EK, Bhojwani D, Jeffries C, Lu Y, Schwab M, Inaba H, Pui CH, Relling MV, Manabe A, Hori H, Schmiegelow K, Yeoh AE, Evans WE, Yang JJ. NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nat Genet*. 2016;48(4):367-73.
54. Bhatia S, Landier W, Hageman L, Kim H, Chen Y, Crews KR, Evans WE, Bostrom B, Casillas J, Dickens DS, Maloney KW, Neglia JP, Ravindranath Y, Ritchey AK, Wong FL, Relling MV. 6MP adherence in a multiracial cohort of children with acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2014;124(15):2345-53.
55. Ma XL, Wang B, Guo HY, Zhang YH, Zhu GH, Duan YL, Yang J, Zhang DW, Jin L, Zhang R, Zhang L, Xie J, Wu MY. [Tolerability of 6-mercaptopurine in children with acute lymphoblastic leukemia]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2010;48(4):289-92.
56. Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, Pei D, Chen Y, Crews KR, Kornegay N, Wong FL, Evans WE, Pui CH, Bhatia S, Relling MV. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine

intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2015;33(11):1235-42.

57. Octavio-Aguilar P, Ramos-Frias J. [Application of population genetics in the field of medicine]. *Biomedica.* 2014;34(2):171-9.
58. Ozhan G, Kara M, Sari FM, Yanar HT, Alpertunga B. Influence of the functional polymorphisms in the organic anion transporting polypeptide 1B1 in the susceptibility to colorectal cancer. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013;17(3):214-8.
59. Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.* 2009;158(3):693-705.