

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLAVDIJA STARE

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV V GENIH ZA INOZINTRIFOSFAT-  
PIROFOSFATAZO IN GLICIN-N-METILTRANSFERAZO Z IZIDOM  
ZDRAVLJENJA OTROŠKE AKUTNE LIMFOBLASTNE LEVKEMIJE**

**POLYMORPHISMS IN INOSINE TRIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASE AND  
GLYCINE N-METHYLTRANSFERASE IN ASSOCIATION WITH THERAPY  
OUTCOMES IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm.

## **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan, mag. farm. za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Iskreno se zahvaljujem asist. Alenki Šmid, mag. farm. za uvajanje in vso pomoč pri laboratorijskem delu, za strokovno pomoč, nasvete in potrpežljivost pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se za ves njen čas in dobro voljo.

Zahvaljujem se tudi vsem strokovnim sodelavkam na katedri za klinično biokemijo, posebno Mateji Benčina, za pomoč in prijaznost, ter predsedniku komisije prof. dr. Odonu Planinšku, mag. farm., in članu komisije doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., ki sta pregledala diplomsko nalogo.

Iz srca hvala tudi moji družini in prijateljem, ki ste mi stali ob strani in me podpirali in vzpodbujali pri nastajanju diplomske naloge.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Klavdija Stare

# VSEBINA

VSEBINA.....	i
POVZETEK .....	iii
ABSTRACT .....	iii
SEZNAM OKRAJŠAV .....	v
1 UVOD.....	1
1.1 AKUTNA LIMFOBLASTNA LEVKEMIJA .....	1
1.1.1 Klasifikacija.....	2
1.1.2 Zdravljenje.....	3
1.1.3 Protokoli .....	6
1.1.4 Faza nadaljevalnega zdravljenja.....	7
1.2 TIOPURINI .....	7
1.2.1 Metabolizem 6-MP .....	8
1.2.2 Neželeni učinki 6-MP in faktorji, ki vplivajo na terapijo.....	10
1.2.2.1 Tiopurin S-metil-transferaza (TPMT).....	12
1.2.2.2 Glicin N-metil-transferaza (GNMT) in S-adenozil metionin (SAM) ....	14
1.2.2.3 Inozin trifosfat-pirofosfataza (ITPA) .....	17
2 NAMEN DELA .....	20
3 MATERIALI IN METODE .....	21
3.1 PREISKOVANCI .....	21
3.2 VZORCI.....	22
3.3 APARATURE, REAGENTI .....	22
3.4 MERJENJE KONCENTRACIJE DNA.....	23
3.5 GENOTIPIZACIJA .....	23
3.5.1 PCR v realnem času.....	23
3.5.2 TaqMan <sup>®</sup> alelna diskriminacija .....	24
3.6 POGOJI IN IZVEDBA DELA .....	25
3.7 STATISTIČNA ANALIZA .....	29
3.7.1 Hardy-Weinbergovo načelo.....	29
4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	30
4.1 POGOSTOST POLIMORFIZMOV .....	30

4.1.1	ITPA 94C>A IN ITPA IVS2+21 A>C.....	30
4.1.2	GNMT 1289 C>T.....	32
4.2	POLIMORFIZMI V POVEZAVI Z IZIDOM ZDRAVLJENJA .....	33
4.2.1	ITPA 94C>A in IVS2+21A>C.....	33
4.2.1.1	Febrilna nevtropenija.....	35
4.2.1.2	Relaps in analiza preživetja.....	37
4.2.1.3	Hepatotoksičnost .....	40
4.2.2	GNMT 1289 C>T.....	40
5	SKLEP.....	46
	KAZALO SLIK IN PREGLEDNIC.....	58

## POVZETEK

Akutna limfoblastna levkemija (ALL) je najpogostejša rakava bolezen pri otrocih. V fazi vzdrževalnega zdravljenja se uporablja purinski analog, predzdravilo 6-merkaptopurin (6-MP), ki zaradi močnega mielosupresivnega delovanja povzroča nevarne toksične učinke (TU). Metabolizem 6-MP je zelo kompleksen, saj je vpletenih veliko encimov. Njihova aktivnost pa vpliva na pojavljanje neželenih TU in s tem povzroči zaplete pri terapiji. Encim inozintrifosfat-pirofosfataza (ITPA) pretvarja 6-tioinozintrifosfat (6-TITP), v 6-tioinozinmonofosfat (TIMP). Polimorfizma v genu za ITPA (94C>A in IVS2+21A>C) zmanjšata aktivnost encima, kar povzroči kopičenje toksičnega 6-TITP, ki potencialno povzroča TU terapije. Drug encim, glicin-N-metiltransferaza (GNMT) je najpomembnejši encim za uravnavanje koncentracije S-adenozil metionina (SAM-a) v celici. SAM s stabilizacijo encima tiopurin S-metiltransferaze (TPMT) ohranja njegovo aktivnost. Znižana aktivnosti encima TPMT povzroči prekomeren nastanek aktivnih metabolitov 6-MP, kar lahko vodi v hudo mielosupresijo, če odmerek ni prilagojen na genotip TPMT. Ker polimorfizem v genu za GNMT (1289C>T) povzroči znižano aktivnost encima in hipotetično zviša koncentracijo SAM-a, smo sklepali, da bi polimorfizem lahko vplival na zmanjšano pojavnost TU, zaradi povečane aktivnosti encima TPMT.

V diplomski nalogi smo želeli preveriti, ali polimorfizmi v genih za ITPA in GNMT vplivajo na izid zdravljenja s 6-MP. V ta namen smo z metodo TaqMan alelne diskriminacije genotipizirali 303 vzorce pediatričnih bolnikov z ALL. S statistično analizo smo preverili vplive genotipov ITPA in GNMT na TU zdravljenja in vpliv ITPA na petletno preživetje brez relapsa. V analizo smo vključili arhivske podatke iz faze vzdrževalnega zdravljenja ter polimorfizme TPMT\*3A, TPMT\*3C in 5,10-metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR) (677C>T in 1298A>C). Polimorfizem IVS2+21A>C je statistično pomembno vplival na povečano pojavnost febrilne nevtropenije. Nasprotno je prisotnost divjega tipa ITPA vplivala na večjo verjetnost za relaps bolezni. Hkrati so imeli ti bolniki tudi manjše petletno preživetje. Polimorfizem GNMT (1289C>T) ni imel statistično pomembnega vpliva na zmanjšanje pojavljanja neželenih učinkov pri bolnikih s polimorfizmom TPMT. Je pa prisotnost 1289C>T vplivala na zmanjšano pojavnost supresije kostnega mozga, pri bolnikih z divjim tipom TPMT. Iz dobljenih rezultatov predvidevamo, da bi bil polimorfizem v genu za ITPA potencialen biološki označevalec za pojav febrilne nevtropenije.

## ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood malignancy. In the maintenance therapy of ALL treatment, an analogue of purine nucleoside, 6-mercaptopurine (6-MP), a widely metabolised prodrug, is included and due to its strong myelosuppression it can induce dangerous toxic effects. The metabolism is complex and includes multiple enzymes. It may lead to life-threatening drug induced toxicity if the enzymes, due to its gene polymorphism, have insufficient activity. The inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) is responsible for converting toxic 6-thioinosine triphosphate (6-TITP) to 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP). Polymorphisms in ITPA gene, 94C>A and IVS2+21A>C, result in decreased enzyme activity, therefore increasing the possibility of 6-MP related toxic effects. Glycine N-methyltransferase is responsible for balancing S-methyl adenosine (SAM) concentration in the cells. SAM stabilizes TPMT enzyme and is therefore maintaining its activity especially the less active forms of the enzyme. Polymorphisms in TPMT gene reduces enzyme activity and if the dose of 6-MP is not reduced, the patient is at risk of toxicity. GNMT polymorphism 1289C>T reduces GNMT enzyme activity and thus, hypothetically, increases SAM. Due to the increased TPMT activity, GNMT polymorphism could influence on TPMT related toxic effects.

Our aim in the thesis was to test if ITPA in GNMT polymorphisms are associated with the outcome of 6-MP therapy. Using TaqMan allelic discrimination method we genotyped 303 samples of paediatric patients with ALL. The data were statistically analysed in correlation with TPMT\*3A, TPMT\*3C, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) (677C>T and 1298A>C) and patient therapy data, obtained from patients' observation charts. We found that patients with ITPA IVS2+21A>C variant alleles suffered more febrile neutropenia than wild type ITPA, whereas wild type ITPA was associated with increased relapse and worse five-year survival. There were no statistically significant associations between GNMT 1289C>T variant alleles and TPMT\*3A and/or 3\*C. However, GNMT variant alleles were associated with decreased bone marrow suppression in wild type TPMT patients. In conclusion, genetic variation in ITPA could be a potential biological marker for febrile neutropenia.

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>5-metilTHF</b>	5-metiltetrahidrofolat
<b>6 –MMPN</b>	6-metilmerkaptopurinski nukleotidi
<b>6 –MP</b>	6-merkaptopurin
<b>6 –TG</b>	6-tiogvanin
<b>6-meTITP</b>	6-metiltioinozin monofosfat
<b>6-TGN</b>	6-tiogvaninski nukleotidi
<b>ALL</b>	akutna limfoblastna levkemija
<b>ALL-BFM</b>	protokol za ALL nemške kooperativne skupine Berlin-Frankfurt-Münster
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>DNPS</b>	de-novo sinteza proteinov
<b>dt</b>	divji tip
<b>GNMT</b>	glicin-N-metiltransferaza
<b>HWE</b>	Hardy-Weinbergovo ravnotežje
<b>ITPA</b>	inozintrifosfat-pirofosfataza
<b>kb</b>	kilobaza
<b>MTHF</b>	metiltetrahidrofolat
<b>MTHFR</b>	5,10-metilentetrahidrofolat-reduktaza
<b>mut</b>	vsaj en mutiran alel
<b>POG</b>	kooperativna skupina pediatrov onkologov (Pediatric Oncology Group)
<b>SAH</b>	S-adenozil homocistein

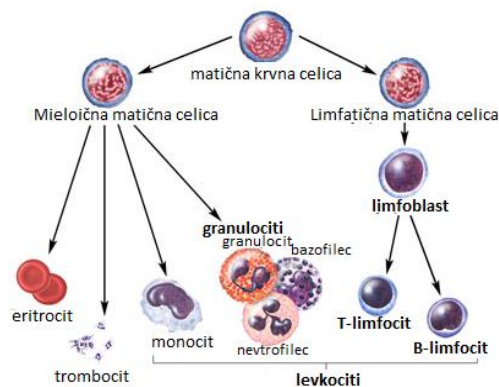
<b>SAM</b>	S-adenozil metionin
<b>SKM</b>	supresija kostnega mozga
<b>SNP</b>	polimorfizem posameznega nukleotida
<b>TITP</b>	tiiozin trifosfat
<b>TPMT</b>	tiopurin S-metiltransferaza
<b>TU</b>	toksični učinek
<b>XO</b>	ksantin-oksidaza



# 1 UVOD

## 1.1 AKUTNA LIMFOBLASTNA LEVKEMIJA

Akutna limfoblastna levkemija (ALL) je vrsta levkemij, rakastih novotvorb krvotvornega tkiva, katerih značilnost je kopičenje enega klona nenormalnih in nefunkcionalnih krvnih celic v kostnem mozgu in v krvi (slika 1) (1). Levkemija je najpogostejša rakava bolezen otrok in predstavlja 25 do 30 % vseh novo odkritih rakavih bolezni pri otrocih, mlajših od 15 let (2). Delimo jih glede na razvojno stopnjo levkemičnih celic in hitrost poteka, na akutno in kronično ter glede na izvor levkemične celice, na limfatične (B ali T) ali mieloične (3).



**Slika 1: Shematski prikaz delitve in razvoja krvnih celic.**

(Prirejeno po (4)).

ALL je posledica spremenjene limfocitne celice, usmerjene v limfocitno celično vrsto B ali T. Posledica je razraščanje in kopičenje nezrelih limfocitov (limfoblastov) v kostnem mozgu (1), limfnem sistemu in ekstramedularnih območjih. Infiltracija limfoblastov v kostnem mozgu moti oziroma zavira preostalo hematopoezo s posledično anemijo, trombocitopenijo in nevtropenijo. Temu sledi razvoj različnih simptomov in znakov, najpogostejši med njimi so okužbe in vročina, utrujenost, bledica, znižanje telesne mase ter bolečine v kosteh. Infiltracija v limfni sistem lahko povzroči limfadenopatijo in hepatosplenomegalijo (5). Če se bolezen razširi v CŽS, kar se pojavlja v manj kot 5% (6), se pojavijo glavobol, bruhanje, papiloedem in paraliza šestega živca (5). Nezdravljena bolezen vodi v hitro smrt (1). ALL se najpogosteje pojavlja v otroštvu, medtem ko druge levkemije najdemo predvsem pri odraslih (akutna mieloična levkemija - AML, kronične levkemije). Tveganje za nastanek levkemije pri otrocih predstavlja medsebojna prepletenost podedovane predispozicije, zunanjih vplivov z levkemogeneznim potencialom in možnost nastanka nekega dogodka (7). Natančni dejavniki, ki bi vodili v razvoj in

nastanek ALL, še niso znani. Verjetno pa ti vplivajo na gene, ki nadzorujejo celično homeostazo limfocitov, s končnim učinkom nereguliranega klonskega razmnoževanja nezrelih progenitornih celic (8). V nastanek bolezni bi bili lahko vpleteni različni etiološki faktorji (9). Majhen, do 5%, a vseeno pomemben delež predstavljajo genetski vzroki, kot sta trisomija enaindvajsetega kromosoma oz. Downov sindrom in Ataxia-telangiectasia (10). Za vzročne faktorje je bilo predlaganih mnogo okoljskih dejavnikov, med njimi so bolj verjetni ionizirajoče sevanje, nekatere kemikalije (2), zmanjšana sposobnost fetusnega ali materinega metabolizma pri detoksifikaciji ali razstrupljanju ksenobiotikov zaradi polimorfizmov v genih za encime, ki pri tem procesu sodelujejo (11). Tveganje, da bo človek v času svojega otroštva zbolel za eno od oblik levkemije je 1:2000, pri čemer bo okoli 80 % primerov odpadlo na ALL. V Sloveniji je v zadnjih 20 letih za to obliko levkemije zbolelo povprečno 13 bolnikov letno (12), vendar na osnovi podatkov Registra raka Republike Slovenije, o številu za levkemijo zbolelih otrok (0-14 let) v obdobju 1998 do 2008, ne moremo sklepati na značilnost podatkovnega niza. Število novih primerov se je sicer v istem obdobju gibalo med 9 do 15, vendar velja ob tem opozoriti, da gre za zelo majhno število primerov, zaradi česar moramo biti pri interpretaciji podatkov previdni (13).

### **1.1.1 Klasifikacija**

ALL je heterogena bolezen z individualnimi, genetsko različnimi levkemičnimi podtipi, ki se med seboj razlikujejo v odgovoru na zdravljenje s citotoksičnimi zdravili (14). Podtipi so definirani na podlagi kromosomskih translokacij, nastanku novih fuzijskih genov, delecij kromosomskih segmentov individualnih genov in podvajanj določenih segmentov ali celotnega kromosoma (10). Pravilna podtipska razdelitev bolezni pri diagnostiki je primarnega pomena, saj se protokoli zdravljenja med različnimi podtipi razlikujejo (15). Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) razdeljuje ALL na B-celično limfoblastno levkemijo (B-ALL) ali T-celično limfoblastno levkemijo (T-ALL), pri čemer se B-ALL še naprej deli glede na prisotnost ali odsotnost specifičnih genetskih abnormalnosti (16):

## **Preglednica I: WHO 2008 klasifikacija ALL**

Pre-celične limfatične neoplazme
B-celična akutna limfoblastna levkemija/limfom
B-celična limfoblastna levkemija/limfom z genetskimi nepravilnostmi
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s t(9;22)(q34;q11.2) BCR-ABL1
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s t(v;11q23) preureditve v MLL genu
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s t(12;21)(p13;q22) TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s hiperploidnostjo
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s hipoploidnostjo (hipoploidna ALL)
B-celična limfoblastna levkemija/limfom s t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH
T-celična limfoblastna levkemija/limfom

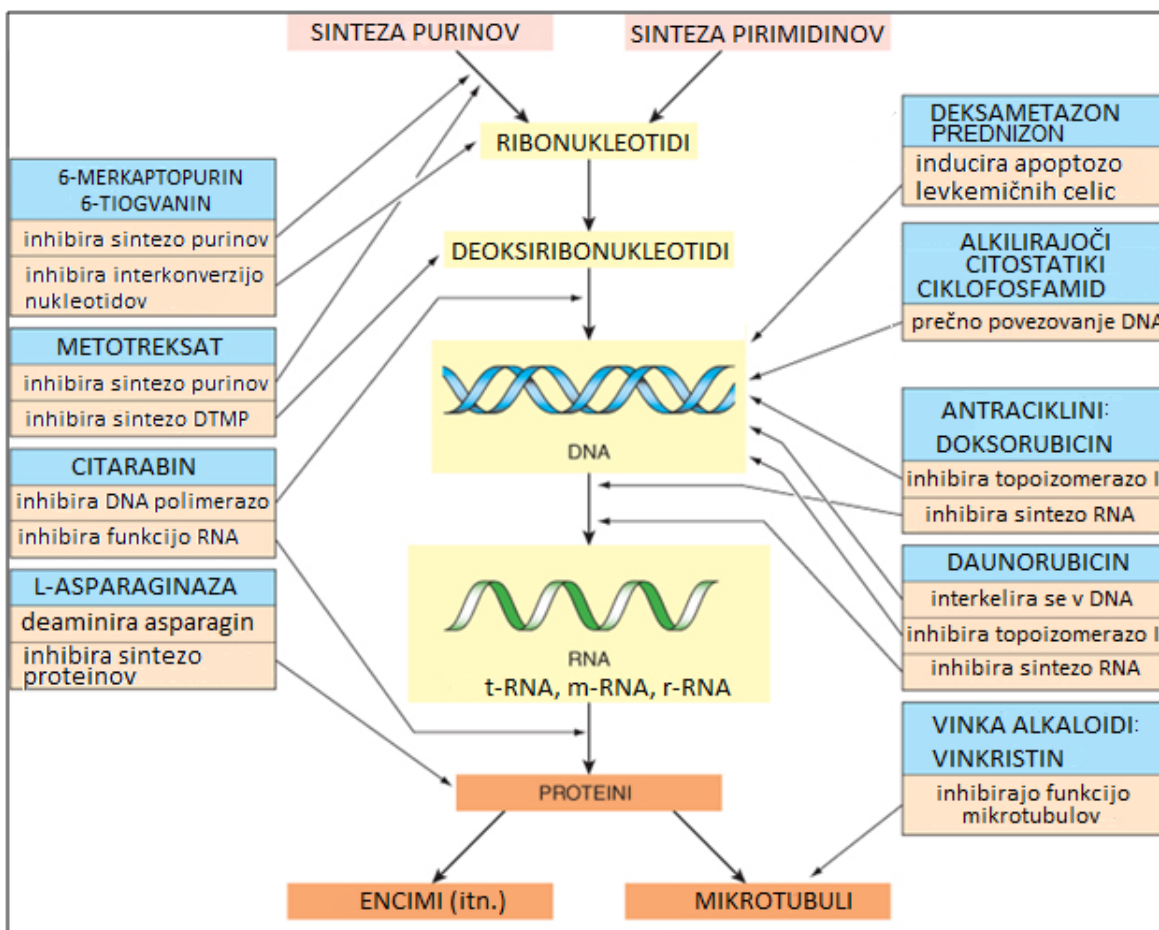
Klasični primer ene od genetske abnormalnosti je skrajšanje dolge ročice kromosoma 22, z recipročno translokacijo kromosoma 9, pri čemer nastane hibridni gen, ki je kariotipsko prepoznan kot Philadelphia kromosom (17). Ta oblika se pojavlja pri 2,5% bolnikov z ALL in je, tako kot oblika s prerazporeditvijo MLL, izredno odporna na konvencionalno terapijo. Izboljšan izid bolezni pa se kaže pri transplantaciji alogenskih hematopoetskih matičnih celic, katerih donor je HLA (humani levkocitni antigen) ujema s brat ali sestra. Podobno je izražanje E2A-PBX fuzijskega proteina povezano s šibkim odzivom pri konvencionalnem antimetabolitnem zdravljenju, vendar je stopnja ozdravljivosti pri bolj intenzivni terapiji kar 80% (14). Te genetske lezije so pomembne pri nastanku levkemije (18), saj naj bi sodelovale pri regulatornih poteh, ki nadzorujejo celično rast in razvoj (19). Poznavanje le teh pa je nezadostno za določitev polnega levkemičnega fenotipa, saj na to vplivajo še ostale onkogene lezije (18).

### **1.1.2 Zdravljenje**

Izbiro zdravljenja za posameznega bolnika določajo številni prognostični faktorji, ki jih ocenijo ob diagnozi in tekom začetne faze zdravljenja. Ti faktorji služijo tudi za napoved tveganja ponovitve bolezni. To je še posebej pomembno zaradi izbire intenzitete zdravljenja, saj otroci, ki imajo boljšo napoved zdravljenja, prejmejo manj intenzivne režime, medtem ko tisti z večjim tveganjem za relaps, prejmejo bolj intenzivno terapijo (20). Za diagnozo je pomembna določitev kliničnih (spol, starost, ekstramedularna bolezen) in bioloških parametrov (število levkocitov, imunofenotipizacija s pretočno citometrijo in citogenetske preiskave za analizo alteracij genetske abnormalnosti) (21, 22). Tudi odgovor zdravljenja in preživetje sta v večini primerov določena s kliničnimi in laboratorijskimi lastnostmi. Kazalci slabe prognoze so višja starost ob diagnozi, št.

levkocitov  $> 30000 \times 10^9$ , imunofenotip B ALL, citogenetski odklon t(9;22)(q34;q11.2), daljši čas do odziva na terapijo in visoke vrednosti minimalne rezidualne bolezni (23). Otroci, diagnosticirani z ALL, so zdravljeni po **standardnem protokolu zdravljenja** (24). Različne države in zdravstveni centri uporabljajo različne protokole zdravljenja, ki se z leti spreminjajo in dopolnjujejo, s ciljem izboljšati izid zdravljenja. Pri dojenčkih, mlajših od 12 mesecev, se ALL biološko razlikuje ter ima slabši izid zdravljenja, kot pri starejših otrocih. Limfoblasti so bolj odporni na kemoterapijo, zato zanje veljajo drugačni, prirejeni protokoli (npr. Interfant-99) (25).

Osnovni principi zdravljenja, vključno z izbiro zdravil (slika 2), so med protokoli zelo podobni. V terapijo so vključena zdravila z različnimi mehanizmi delovanja, saj je bolezen zelo heterogena.



**Slika 2: Zdravilne učinkovine in njihovo delovanje pri terapiji ALL, ki se uporabljajo v protokolih ALL-BFM.** (Prirejeno po (26)).

Zdravljenje je razdeljeno na tri faze (27):

- faza indukcije oziroma remisijsko – indukcijska faza
- konsolidacijska faza
- vzdrževalna faza

Cilj **indukcijske** (remisijsko-indukcijske) faze je uničiti kar največje možno število levkemičnih celic v kostnem mozgu, vzpostaviti normalno hematopoezo in izzvati remisijo (27). Remisija je stanje brez dokazov obstoja levkemije, odsotnost testikularne bolezni ali bolezni CŽS, pri čemer mora kostni mozeg izkazovati normalno celularnost z manj kot 5% limfoblastov (28). Terapija temelji na kombinaciji treh ali štirih zdravil, in sicer; vinkristin, kortikosteroidi (prednizon, prednizolon, deksametazon) in L-asparaginaza. Običajno se četrto ali peto zdravilo (antraciklin in/ali ciklofosfamid) doda otrokom z ALL z visokim ali zelo visokim tveganjem (11). Ta faza običajno traja od 4 do 6 tednov (20).

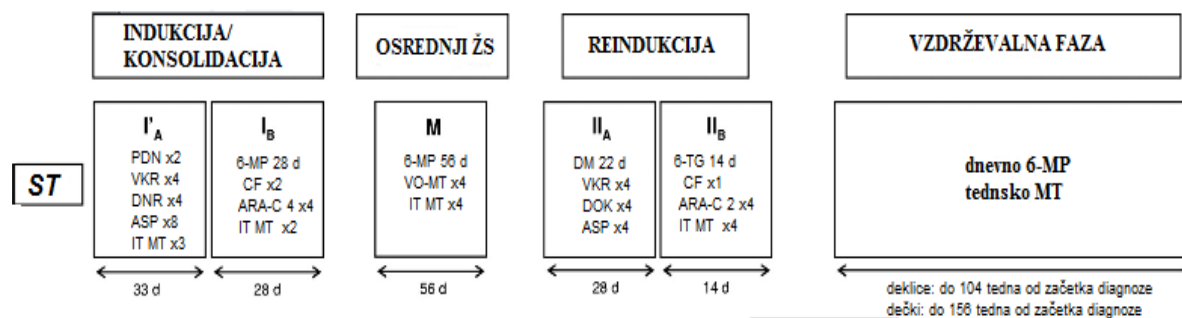
Faza **konsolidacije** je sestavljena iz dveh faz; post-remisijaska intenzifikacijska in pozna intenzifikacijska ali re-indukcijska (21). Cilj te faze je uničiti še levkemične celice, ki ostanejo po terapiji indukcije. V tej fazi so vključene podobne kombinacije zdravil kot v prvi, vendar v bolj intenzivni obliki. Najbolj pogosto so v režim zdravljenja dodani še metotreksat in L-asparaginaza v visokih odmerkih ter dnevna terapija s 6-merkaptopurinom (29). V fazi re-indukcije ali pozne intenzifikacije se ponovi terapija začetne remisijsko-indukcijske faze, ki nastopi približno 3 mesece po začetku zdravljenja (21).

Sledi še **vzdrževalna** faza, s ciljem preprečitve relapsa bolezni. Terapija temelji na dnevnem peroralnem jemanju **6-merkaptopurina** in tedenskem peroralnem jemanju **metotreksata** v visokih odmerkih, ki sežejo do mej tolerance in compliance (21). V nekaterih protokolih sta periodično dodana še vinkristin in kortikosteroidi. Ta faza zdravljenja je najdaljša, s skupnim trajanjem terapije do dveh ali treh let. Zdravljenje je, za bolnike s povečanim tveganjem za relaps, usmerjeno tudi v CŽS, saj običajna sistemska kemoterapija ne prehaja krvno-možganske bariere. Terapija poteka v obliki kranialnega obsevanja, intratekalne kemoterapije z metotreksatom, citarabinom ali kortikosteroidom ali visoko odmerne sistemske kemoterapije, da bi uničili še levkemične celice v CŽS (29). Pacienti, pri katerih pride do relapsa bolezni, še posebno tisti z zgodnjim relapsom v

kostnem mozgu po treh letih diagnoze, imajo slabo prognozo (30). Pri teh pacientih vsi že določeni prognostični faktorji izgubijo vrednost, saj relaps obravnavajo kot novo stanje in jih je zato potrebno določiti na novo. V teh primerih so pomembni drugi faktorji; **čas do relapsa**, mesto relapsa in imunofenotip levkemičnih celic (20). Zdravljenje bolnikov s poznim relapsom je največkrat vključevalo nadaljnjo, bolj intenzivno kemoterapijo in presaditev hematopoetičnih zarodnih celic (HSCT) po drugi remisiji (30). Indikacija za HSCT kljub temu še ni dorečena a ostaja glavna, ko vse ostale možnosti odpovejo. Za te bolnike je potreba po novih, alternativnih zdravilih (20).

### 1.1.3 Protokoli

V diplomski nalogi smo analizirali vzorce bolnikov z ALL, ki so se zdravili po različnih protokolih na Pediatrični kliniki v Ljubljani. Do leta 1983 je bilo zdravljenje povzeto po protokolih ameriške skupine Pediatric Oncology Group (POG), od leta 1983 dalje pa po različnih protokolih nemške kooperativne skupine Berlin-Frankfurt-Münster (BFM): ALL-BFM 83, ALL-BFM 86, ALL-BFM 90, ALL-BFM 95 in protokol interkontinentalne študije (ALL IC BFM 2002). Slika 3 prikazuje primer protokola ALL-BFM 95, pri katerem so podaljšali trajanje vzdrževalne faze pri dečkih. Izkazalo se je za neugodno, zato so ga v kasnejših protokolih zopet skrajšali na 104 tedne (12).



**Slika 3: Protokol ALL-BFM 95 za skupino s standardnim tveganjem.** (Prirejeno po (31)) ST: standardno tveganje, PDN: prednizolon, VKR: vinkristin, DNR: daunorubicin, ASP: asparaginaza, IT MT: intratekalni metotreksat, 6-MP: 6-merkaptopurin, CF: ciklofosamid, ARA-C:arabinozid citarabin, VO-MT: visoko odmerni metotreksat, DM: deksametazon, DOK: doksorubicin, 6-TG: 6-tiogvanin, d: dan, I<sub>A</sub>: indukcija, I<sub>B</sub>: konsolidacija, M: del konsolidacijske faze, terapija usmerjena v CZŠ, II<sub>A,B</sub>: drug del konsolidacijske faze – bolj intenzivna terapija.

Protokoli se med seboj razlikujejo predvsem po intenzivnosti zdravljenja in trajanju faze vzdrževalnega zdravljenja. V vseh fazah zdravljenja je vključen 6-MP, ki lahko povzroči nevarne neželene učinke, vendar v kombinaciji vsaj še treh različnih citotoksičnih zdravil z različno paleto neželenih stranskih učinkov, ki se med seboj prekrivajo in seštevajo. To

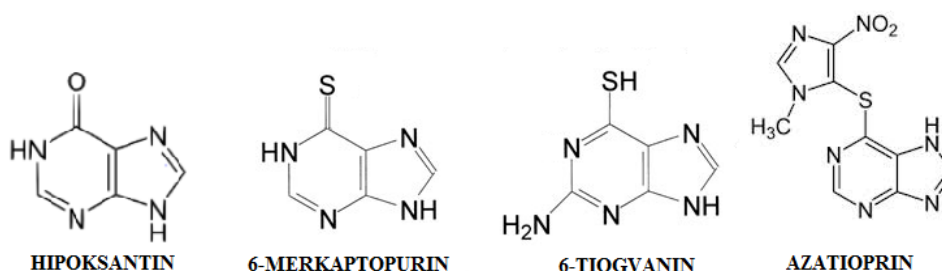
otežuje preučevanje vplivov na pojavljanje toksičnih učinkov zdravila. Za preučevanje je zato najbolj primerna faza vzdrževalnega zdravljenja, saj sta v terapijo vključena samo dva sistemska citostatika, poleg 6-MP še metotreksat, hkrati pa so citostatiku izpostavljeni najdaljši čas. Priloga 1 prikazuje razlike med protokoli ALL-BFM 83/86/90/95. Razviden je razvoj meril za stratifikacijo na skupine tveganja, z določitvijo faktorja tveganja (FT), spremenjene dolžine posameznih faz ter dodatni elementi (protokoli) v zdravljenju.

#### 1.1.4 Faza nadaljevalnega zdravljenja

Vsi bolniki so v fazi nadaljevalnega zdravljenja, v peroralni obliki, dnevno prejeli 6-MP in tedensko metotreksat (MT). V protokolu ALL-BFM 83 so z randomizacijo bolnikov primerjali 18 mesečno in 24 mesečno trajanje zdravljenja. Bolniki, na Pediatrični kliniki Ljubljana, v vseh teh protokolih niso bili randomizirani. Zdravljeni so bili po standardnih protokolih kot kontrolna skupina (32), zato je faza nadaljevalnega zdravljenja v protokolu ALL-BFM 83 potekala do 24 mesecev od začetka diagnoze in v protokolu ALL-BFM 86 samo 18 mesecev. V protokolu ALL-BFM 90 so se vsi zdravili 24 mesecev, v protokolu ALL-BFM 95 pa so se dečki zdravili dodatnih 12 mesecev. Po protokolu ALL IC BFM 2002 dalje, se vsi bolniki zdravijo 24 mesecev po začetku diagnoze.

## 1.2 TIOPURINI

Pomemben element zdravljenja ALL predstavljajo tiopurini (slika 4), ki se široko uporabljajo tudi za zdravljenje ne-Hodgkinovega limfoma pri otrocih, Crohnove bolezni, ulcerativnega kolitisa, sistemskega eritematoznega lupusa (33), revmatoloških in dermatoloških bolezni (34) in pri transplantaciji organov (35). Tiopurini - azatioprin (AZA), 6-merkaptopurin (6-MP) in 6-tiogvanin (6-TG) - so purinski analogi, ki delujejo kot antagonisti endogenim purinom, esencialnim komponentam DNA, RNA in nekaterih encimov (34). Pri zdravljenju ALL se najpogosteje uporablja 6-MP, analog hipoksantina.



Slika 4: Kemijska struktura tiopurinov in hipoksantina.

6-MP je predzdravilo, ki mora biti za svoje delovanje podvržen obsežnemu metabolizmu v celici (36). Odgovor na zdravljenje je zato odvisen od koncentracije metabolitov (6-tiogvaninski [**6-TGN**] in 6-metilmerkaptopurinski nukleotidi [**6-MMPN**]), ki jih merimo v rdečih krvnih celicah (37). Znotrajcelični metaboliti 6-MP izkazujejo svoj citotoksični učinek preko nespecifičnih mehanizmov, ki naj bi bili glavni mehanizem delovanja v terapiji ALL. Z blokiranjem replikacije in transkripcije, preko vključevanja v DNA in RNA (38), povzročijo celično smrt, pri čemer je citotoksičnost specifična za S-fazo celičnega cikla (34). S specifičnim mehanizmom pa blokirajo Rac-1 usmerjeno signalno transdukcijo (39) in s tem vodijo v apoptozo T-limfocitov (40).

Običajni odmerek za odrasle in otroke je 2,5 mg/kg telesne mase na dan ali 50 do 75 mg/m<sup>2</sup> telesne površine na dan, vendar sta odmerek in trajanje zdravljenja odvisna tako od vrste kot tudi od odmerka drugih citotoksičnih zdravil, ki se jih uporablja sočasno s 6-MP. Odmerek je potrebno skrbno prilagoditi vsakemu posameznemu bolniku (41). Najpogostejši režimi prilagajanja odmerka temeljijo na periodičnem pregledu krvne slike, vsaj na vsake 2 tedna (42), s ciljnimi številom levkocitov 2000-3000/μL (31). Nižji začetni standardni odmerki 6-MP so priporočljivi za bolnike z intenzivno kemoterapijo, pri katerih je pričakovana zmanjšana toleranca kostnega mozga. Pri bolnikih s polimorfizmi v genu za TPMT se standardni odmerek dodatno zniža, glede na genotip TPMT. Odmerek 6-MP se povečuje, dokler št. levkocitov ne pade pod  $3.0 \times 10^9/L$ . V primeru padca št. levkocitov pod  $1.5 \times 10^9/L$ , št. nevtrofilcev na  $0.3-0.5 \times 10^9/L$  ali št. trombocitov pod  $50 \times 10^9/L$ , se odmerek zniža ali preskoči. Odmerek se prav tako zniža ali prekine, če vrednost bilirubina naraste nad trikratno zgornjo referenčno mejo ali če se vrednosti jetrnih aminotransferaz povečajo na več kot desetkratno zgornjo referenčno mejo, z nadaljnjim zviševanjem (43).

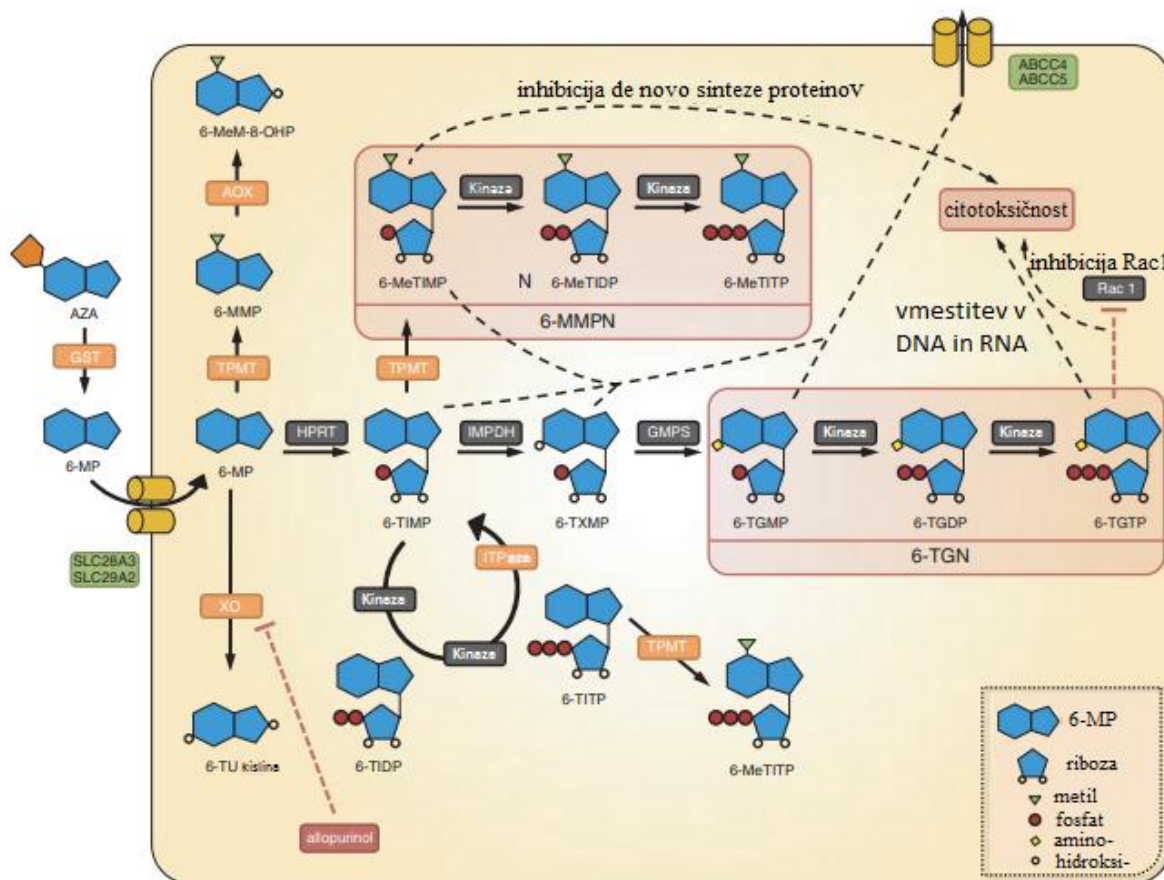
### 1.2.1 Metabolizem 6-MP

6-MP se metabolizira po treh kompetitivnih encimskih poteh, kataliziranih z dvema katabolnima encimoma, ksantin-oksidado (XO) in **tiopurin S-metiltransferazo (TPMT)**, in anabolnim encimom hipoksantin-gvanin-fosforiboziltransferazo (HGPRT) (33). Po katabolni poti se 6-MP pretvori do terapevtsko neaktivnih produktov. Po privzemu 6-MP v celico, preko transportnih prenašalcev SLC28A2, SLC28A3, SLC29A1 in SLC29A2, ga encim XO katabolizira do tiosečne kisline (40), ki se izloči z urinom. Druga katabolna pot poteče z encimom TPMT do 6-metilmerkaptopurinskih nukleotidov (**6-MMPN**) (44). 6-MMPN je v povišani koncentraciji edini neodvisen faktor za nastanek mielosupresije (40)



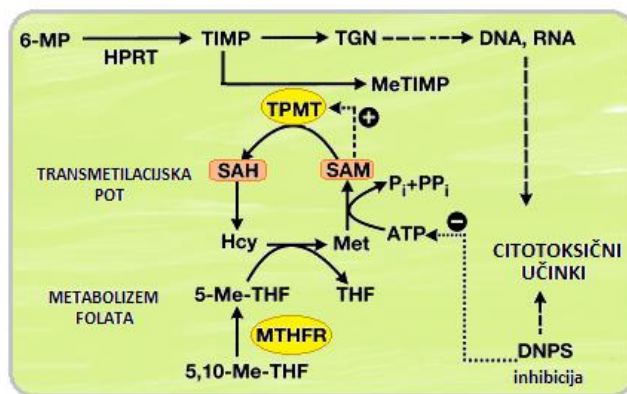
ter možen vzrok za hepatotoksičnost (45). HGPRT katalizira prvo anabolno reakcijo, pri kateri nastane 6-tioinozin monofosfat (6-TIMP) (38), ki se naprej metabolizira po treh različnih poteh:

1. Kinaze ga v dveh stopnjah pretvorijo v 6-tioinozin trifostat (6-TITP), ki se s TPMT katalizirano reakcijo pretvori v neaktiven 6-metiltioinozin trifostat (6-meTITP) oziroma z encimom **inozintrifosfat-piروفosfataza (ITPA)** katalizirano reakcijo nazaj v 6-TIMP.
2. Preko **TPMT** (slika 5) se pretvori v 6-MeTIMP, pri čemer je **S-adenozil metionin (SAM)** (slika 6), donor metilne skupine in se pri tem pretvori v **S-adenozil homocistein**. 6-meTIMP je močan inhibitor de-novo sinteze purinov (DNPS). Če je koncentracija tega metabolita previsoka, lahko povzroči pomanjkanje purinskih nukleotidov s posledičnim citotoksičnim delovanjem (46). 6-meTIMP se nadalje s kinazami pretvori v neaktivne metabolite 6-meTIDP in 6-meTITP. 6-meTIMP, 6-meTIDP in 6-meTITP predstavljajo 6-MMPN (40).



**Slika 5: Metabolizem 6-MP. Prirejena po (40)**

Rdeče črtkane črte prikazujejo poti inhibicije, ABCC- P-glikoproteinska črpalka. Ostale kratice so razložene v besedilu.



**Slika 6: Katabolna pot metabolizma 6-MP, z encimom TPMT.**

SAM je pozitivni modulator TPMT in donor metilne skupine pri reakciji. Prikazano je, da pride do pomanjkanja ATP zaradi DNPS, kar ima lahko številne posledice zaradi manjše znotrajcelične razpoložljivosti SAM-a.

(Prirejeno po (46))

- Po anabolni poti pa se 6-TIMP, z encimom inozin monofosfat-dehidrogenazo (IMPDH), pretvori v 6-tioksantin monofosfat (6-TXMP), iz tega z gvanozin-monofosfat-sintetazo (GMPS) nastane 6-tiogvanin monofosfat (6-TGMP).

6-TGMP se pod vplivom kinaz in reduktaz s fosforilacijo pretvori v 6-tiogvanin difosfat (6-TGDP) in 6-tiogvanin trifosfat (6-TGTP). 6-TGMP, 6-TGDP in 6-TGTP ali **6-tiogvanini (6-TGN)** predstavljajo farmakološko aktivne citotoksične metabolite, lažne baze, ki se vgradijo v RNA. Z encimsko redukcijo 6-TGN-jev nastane deoksi-tiogvanozin trifosfat (dTGTP), lažen substrat za DNA polimerazo, ki ga vgradi v DNA. Vgradnja teh metabolitov v RNA in DNA povzroči zaustavitev celičnega cikla in apoptozo (programirano celično smrt), preko procesa imenovanega »mismatch repair« (MMR) oziroma popraviljanje neujemanja nukleotidov (47), z vlogo odstraniti napake DNA polimeraze (48).

### 1.3 NEŽELENI UČINKI 6-MP IN FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA TERAPIJO

Variabilnost terapevtske citotoksičnosti 6-MP je pri standardnem odmerku zelo velika in hkrati multifaktorska, zato jo je težko nadzorovati (49). Genetika levkemičnih celic, intenzivnost metabolizma in sistemski očistek 6-MP se med pacienti razlikujejo (8), zato koncentracija aktivnih toksičnih metabolitov ni enaka. To vpliva na odziv zdravljenja, celično funkcijo in ne nazadnje na toksične neželene učinke (v nadaljevanju toksične učinke (TU)). Dodatno je za variabilnost odgovoren še kompleksen metabolizem z

vpletenostjo različnih encimov s fiziološko različno stopnjo aktivnosti. Za to so odgovorni genetski polimorfizmi, ki vplivajo na izražanje ali funkcijo gena v normalnih zdravih in rakavih celicah. Ti polimorfizmi **spremenijo aktivnost encimov**, ki sodelujejo pri metabolizmu zdravil, njihovih transporterjev ali tarč. Te spremembe lahko vplivajo na učinkovitost ter toksičnost antilevkemičnih zdravil, kot so tiopurini (50), oziroma na samo terapijo zdravljenja.

Uspešnost zdravljenja ALL je kar 80% (51), vendar ima zdravljenje v primeru 6-MP, zaradi ozkega terapevtskega okna zdravila in dolgotrajne izpostavljenosti, lahko tudi smrtonosne učinke. 20% pojavnost relapsa bolezni, kljub visokemu uspehu zdravljenja, predstavlja velik problem (52). Življenjsko ogrožajoči učinki zahtevajo tudi (začasno) prekinitve terapije. Najpogosteje opisani so slabost, supresija kostnega mozga, oportunistične okužbe, hepatitis in pankreatitis (53).

Neželene učinke 6-MP lahko razdelimo v:

- od odmerka odvisne:  
najresnejši so mielosupresija z levkopenijo, trombocitopenijo in včasih pancitopenijo ter hepatotoksičnost,
- idiosinkratične ali od odmerka neodvisne:  
slabost, vročina, srbečica, gripi podobni simptomi, izpuščaji, akutni pankreatitis, alergične reakcije (34).

Povišana stopnja tvorbe farmakološko neaktivnih metabolitov, njihova eliminacija, nastajanje in akumulacija toksičnih stranskih metabolitov ter previsoka ali prenizka koncentracija farmakološko aktivnih metabolitov, vplivajo na izid zdravljenja. Na vse te procese vplivajo encimi metabolizma 6-MP, zato v njih iščemo vzroke za TU, relaps bolezni in optimizacijo terapije.

S farmakogenetskimi študijami so raziskovalci odkrili že veliko genetskih variacij, ki bi lahko vplivale na različne odgovore zdravljenja ALL. Do danes so vplivi izmed raziskanih polimorfizmov dokončno potrjeni le pri genu za TPMT, pri katerem so v klinični uporabi tudi že farmakogenetski testi, za lažje prilagajanje odmerkov 6-MP za posameznega bolnika. V fazi intenzivnih raziskav so še polimorfizmi v genu za ITPA, 5,10-metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR) ter drugi faktorji. Raziskani so bili proteini, ki

transportirajo različne biološke substrate in delujejo kot črpalke za izločanje zdravil iz celice – ABCC (ATP-binding cassette sub-family C) ali MRP (multidrug resistance related proteins). Ugotovili so, da ABCC4 ščiti celice pred toksičnostjo 6-MP z aktivnim črpanjem 6-TG iz celice, povečana ekspresija pa kaže na povečano odpornost do 6-MP (54). *In-vitro* študije kažejo, da bi bilo zmanjšano delovanje influx transporterjev SLC28A3 lahko razlog za neuspeh terapije (55). Študij o vplivu XO je malo, vendar je znano, da obstaja veliko polimorfni različic tega encima, ki vplivajo na njegovo aktivnost. Čeprav aktivnost XO lahko enostavno ocenimo s količino nastale 6-tiosečne kisline v urinu, učinka variacij v genu za XO na učinkovitost 6-MP še ne poznamo dovolj, zato danes še nima kliničnih uporabnosti (56). Individualne variabilnosti encima HGRPT bi tudi lahko bile potencialen razlog za različne koncentracije metabolitov 6-MP in izidov terapije. Visoka aktivnost HGPRPT se je v nedavni študiji, neodvisno od TPMT aktivnosti, izkazala kot potencialen napovedovalec nevarnih koncentracij 6-TGN in pojava levkopenije (57). Poleg teh in mnogih drugih še ne raziskanih faktorjev, je za vpliv TU potrebno pri vzdrževalnem zdravljenju upoštevati tudi vplive metotreksata, inhibitorja folne kisline, ki ga morajo bolniki z ALL, prav tako kot 6-MP, jemati skozi daljše obdobje. Tudi polimorfizem encima MTHFR, ki je pomemben za homeostazo folne kisline, potencialno vpliva na neželene izide zdravljenja (58). MTHFR katalizira 5,10-metilentetrahidrofolat (5,10-metilenTHF), iz katerega nastaja 5-metiltetrahidrofolat (5-metilTHF), ko-substrat za nastanek metionina, ki se nato pretvori v SAM, molekulo ki pomaga ohranjati aktivnost encima TPMT. Polimorfizmi v genu za MTHFR, ki zmanjšajo aktivnost encima, bi lahko imeli pomembno vlogo pri določitvi fenotipa TPMT, saj bi znižana znotrajcelična koncentracija SAM-a vplivala na stabilnost in aktivnost encima TPMT (59).

V diplomskem delu se bomo posvetili le vplivom polimorfizmov v genu za ITPA in glicin-N-metiltransferazo (GNMT), s posrednim vplivom na TPMT preko SAM-a.

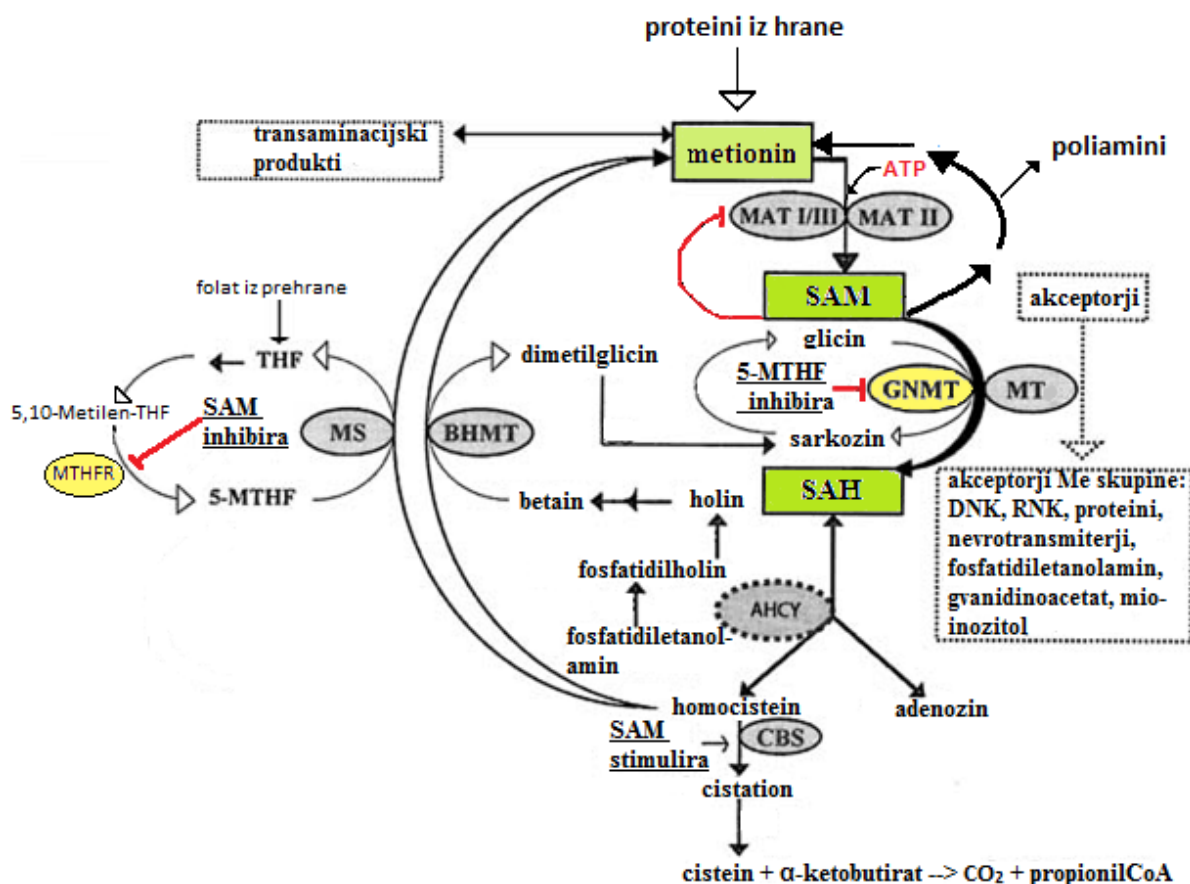
### **1.3.1 Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT)**

Encim tiopurin S-metiltransferaza (TPMT; EC 2.1.1.67) ima pomembno vlogo v metabolizmu 6-MP in hkrati predvideva njegovo mielotoksičnost (51). Aktivnost encima močno vpliva na razmerje 6-TGN in 6-MMPN (37). Genetski polimorfizmi TPMT predstavljajo enega najbolj razvitih farmakogenetskih primerov (50). Posamezniki, ki podedujejo gen, ki vodi do nastanka encima z zmanjšano aktivnostjo, izkazujejo zmanjšano toleranco za zdravljenje s tiopurini. Mehanizem je odsotna ali zmanjšana

inaktivacijska pot, s TPMT katalizirano metilacijo 6-MP in 6-TGN, v hematopoetskem tkivu, kar vodi v preveliko izpostavljenost metabolitom 6-MP. Če ti bolniki ne prejmejo zmanjšane odmerka teh zdravil, bo prišlo do hude **mielosupresije**, ki vpliva na zdravljenje z ostalimi kemoterapevtiki, lahko pa vodi tudi v smrt (60). Obratno je, za bolnike s prenizkim odmerkom in normalno aktivnim encimom, povečana verjetnost za **relaps** (36). Do sedaj je znanih vsaj 33 polimorfizmov (61), vendar so zaradi največje frekvence pojavljanja klinično najpomembnejši TPMT\*3A (460G>A in 719A>G), TPMT\*3B (G460A), TPMT\*3C (719A>G) in TPMT\*2 (238G>C) (60). Genotip TPMT\*1/\*1 je divji tip, z normalno aktivnostjo in je prisoten pri 86-97% pacientov. Približno 3-14% pacientov ima heterozigotni genotip z eno od TPMT alelnih različic, le 0,03-0,6% ima homozigotni genotip TPMT z dvema nefunkcionalnima aleloma z nizko ali brez encimske aktivnosti (62). Sedaj smernice NCCN (National Comprehensive Cancer Network) in povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPc) za 6-MP priporočajo testiranje genotipa TPMT pri pacientih, ki imajo v vzdrževalnem zdravljenju vključene 6-MP, še posebno pri pacientih, ki so že doživeli hudo mielotoksičnost. TPMT je sedaj znana farmakogenomska determinanta toksičnosti 6-MP, ki ima hkrati velik vpliv na minimalno rezidualno bolezen (63). Relling in sod.(62) predlagajo polni odmerek za paciente z divjim tipom TPMT, zmanjšan odmerek za 30-70% pri heterozigotih in vsaj desetkrat zmanjšan odmerek za homozigotni tip TPMT. Kljub temu se kaže, da so na odziv terapije vpleteni še drugi farmakogenetski in **nefarmakogenetski** faktorji, saj lahko z genotipom TPMT razložimo le okrog 10% skupne toksičnosti 6-MP in morda okrog ene tretjine mielotoksičnosti (64), da je 15 – 28% pojavnost stranskih učinkov bolj pogosta kot prevalenca polimorfizmov TPMT (36) in ne nazadnje, kot že omenjeno, je v metabolizmu tiopurinov vključenih veliko encimov. Nefarmakogenetski vpliv se kaže v primeru SAM-a, saj se poleg glavne vloge metilnega donorja veže tudi na protein TPMT in s tem stabilizira njegovo 3-D strukturo (46). Ker genetski polimorfizmi v proteinski sekvenci TPMT pospešijo znotrajcelično razgradnjo encima (65), mu SAM s stabilizacijo ohranja encimsko aktivnost, zato bi posledično lahko vplival na zmanjšano toksičnost 6-MP (46).

### 1.3.2 Glicin-N-metiltransferaza (GNMT) in S-adenozil metionin (SAM)

Glicin-N-metiltransferaza (GNMT; EC 2.1.20) je tetrameren protein, ki je tesno povezan z metabolizmom folata in metionina (66) ter ključni encim pri vzdrževanju ravnotežja metilacije v celici, z **uravnavanjem koncentracije SAM-a** in **ravnotežja SAM:SAH** (52). Encim prenaša metilno skupino iz SAM-a na glicin, pri čemer nastane SAH (67) in biološko neaktiven produkt sarkozin (68), ki se pretvori nazaj v glicin (69) (slika 7). SAM je zelo pomembna molekula, ki jo najdemo v vseh živih organizmih. Je glavni biološki donor metilne skupine, prekursor za biosintezo poliaminov in glutationa v jetrih (70) ter pomemben regulator replikacije, transkripcije in translacije. Pomembno vlogo ima tudi pri celični rasti in apoptozi (71). SAM se sintetizira iz **metionina** in **ATP** s pomočjo encima S-adenozilmetionin-sintetaze (MAT) (72) v ciklu metionina, kot ga prikazuje slika 7.



**Slika 7: Shematični prikaz vloge GNMT in sintezne poti SAM-a ter njegova regulacija.** Rdeče črte prikazujejo inhibicijo. (Prirejeno po (73))

V normalnih pogojih se veliko SAM-a porabi za transmetilacijske reakcije, z **GNMT** katalizirano pretvorbo v SAH (74). SAH se odstrani s pretvorbo v homocistein in adenzin, homocistein pa se z MTHFR katalizirano reakcijo, pri normalni koncentraciji SAM-a, pretvori nazaj v metionin. 5-metilTHF je pri reakciji donor metilne skupine. Če je koncentracija SAM-a previsoka, SAM alosterično inhibira MTHFR in usmeri pretvorbo homocisteina v cistein z indukcijo cistation- $\beta$ -sintaze (CBS) in tako uravna razmerje SAM : SAH (75). Koncentracija SAM-a je v celici pod vplivom mnogih dejavnikov, kot so: vsebnost metionina, folata, ATP, porabe SAM-a za sintezo drugih molekul, izražanja encimov, ki vplivajo na biosintezo SAM-a (70) (MAT, MTHFR, TYMS) ter nenazadnje encima GNMT, ki med metil transferazami najpomembneje vpliva na pretvorbo SAM-a v SAH (76).

GNMT je v regulacijo SAM-a in razmerje SAM:SAH vpleten v treh alosteričnih povezavah (66) (slika 7):

- SAM alosterično inhibira MTHFR, ki katalizira nastanek 5-metilTHF iz 5,10-metilenTHF,
- 5-metilTHF, primarni donor metilne skupine za remetilacijo homocisteina, inhibira GNMT,
- GNMT ima višjo  $K_i$  vrednost za SAH od ostalih metiltransferaz, zato ga SAH le šibko inhibira.

Torej, SAM pri višji koncentraciji inhibira MTHFR, zato se zmanjša koncentracija 5-metilTHF in njegova inhibicija GNMT. GNMT ni več inhibiran, zato lahko pospešeno zmanjšuje koncentracijo SAM-a in ga pretvarja v SAH. Variranje v aktivnosti GNMT zato vpliva na aktivnosti drugih metiltransferaz (77).

Gen za GNMT leži na kromosomu 6p12 (68), velik je okoli 10 kb, vsebuje 6 eksonov in 5 intronov (slika 8). Aktiven je v obliki homotetramera in kaže sigmoidno katalitično aktivnost (77).



**Slika 8: Humani gen GNMT.**

Sestavljen je iz 6 eksonov, z označenim polimorfizmom 1289 C>T, ki leži na 5'-koncu promotorske regije. (Prirejeno po (78))

Encim GNMT se izraža v periportalni regiji jeter, kjer predstavlja 1-3% vseh citosolnih proteinov, eksokrinem tkivu trebušne slinavke, proksimalnem zvitem tubulu v ledvicah in prostati (68). Globularno strukturo tetramernega proteina GNMT vežejo hidrofobne interakcije med podenotami. Medsebojne interakcije vseh podenot so zato pomembne za aktivnost encima (79). SNP-ji v genu zmanjšajo encimsko aktivnost in vplivajo na ravnotežje SAM:SAH ter tako zmotijo delovanje mnogih encimov, ki so vpleteni v cikel metionina (80).

### ***1.3.2.1 Polimorfizmi v genu za GNMT***

Prvo znižano aktivnost encima GNMT so pri ljudeh odkrili šele leta 2001. Pri treh otrocih so zaznali povišane serumske transaminaze s hipermetioninemijo, zvišano koncentracijo SAM-a in normalno ali rahlo znižano koncentracijo SAH-a. Odkrili so jim različne SNP-je na genu za GNMT, s posledično znižano aktivnostjo encima GNMT. Polimorfizem 1487 T>C ima 10% aktivnost, 3715 C>A 75% aktivnost ter 3415 A>G z le 0,5% preostale aktivnosti encima v primerjavi z divjim tipom (67, 76, 81). Tseng in sod. (82) so našli nove tri pogoste SNP-je, na mestih 1289 C>T na 5'UTR regiji, 1586 T>G na intronu 1 in 2666 G>A na intronu 2, ki prav tako zmanjšajo aktivnost encima GNMT. Vzročno so jih povezali z nastankom hepatokarcinoma. Beagle in sod. (66) so polimorfizem 1289 C>T sam in v kombinaciji z MTHFR 677 C>T in MTHFR 1298 A>C povezali z zvišano koncentracijo plazemskega celokupnega homocisteina pri mladih ženskah, s kontrolirano omejitvijo vnosa folata.

Informacij o vplivu polimorfizmov na strukturo, funkcionalnost in dinamiko encima ni dovolj, kar otežuje validacijo simulacije molekularne dinamike (52). Znano je, da je kvarterna, terciarna in sekundarna oblika polimorfni oblik encima skoraj identična strukturi divjega tipa, zato lahko trdimo, da je zmanjšana stabilnost funkcija stabilnosti vsake posamezne podenote (79) in da medsebojne interakcije aminokislin v strukturi proteina vplivajo na zmanjšano aktivnost mutiranih oblik (83).

V diplomski nalogi bomo preučevali polimorfizem 1289C>T, pri katerem se na mestu 429 aminokislina glutamat zamenja z alaninom (Glu429Ala), v povezavi s SAM-om in njegovim potencialnim vplivom na TPMT.



### 1.3.3 Inozintrifosfat-pirofosfataza (ITPA)

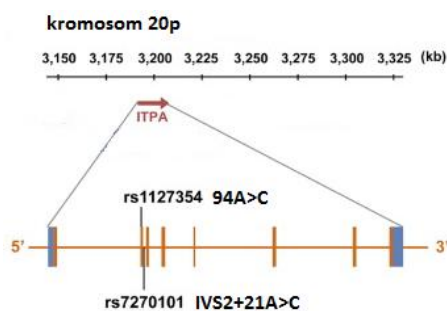
Inozintrifosfat-pirofosfataza (ITPA; EC 3.6.1.19) je encim, ki katalizira pirofosfohidrolizno reakcijo, pri kateri se (deoksi-) inozin trifosfat (dITP, **ITP**) in (deoksi-) ksantozin trifosfat (dXTP, XTP) pretvorijo v ustrezne mono fosfatne oblike (**IMP**, dIMP, XMP, dXMP) (36, 38). Do drugih nukleozidnih fosfatov kot so UTP, dCTP, TTP, (d)ATP ima za katalizo zelo nizko aktivnost ter nič aktivnosti do IDP in IMP, zato je specifičen za prej omenjene nukleozide (84). **IMP** je **centralni intermediat** v metabolizmu purinov, ki se lahko pretvori do pomembnih celičnih molekul ITP, ATP in GTP (85). Funkcija encima še ni popolnoma jasna, vendar lahko rečemo, da deluje kot »hišni čistilec«, ki odstranjuje potencialno nevarne endogene metabolite in uravnava akumulacijo intermediatov, ki nastajajo v biokemijskih poteh. ITP, dITP, XTP in dXTP so **analogi kanoničnih nukleotidov**, zato spadajo med ne-kanonične nukleozidne trifosfate (NTP). Nastajajo z oksidacijo, deaminacijo in drugo modifikacijo kanoničnih nukleotidov in se z njimi lahko pariyo. Če se te oblike vključijo v DNA povzročijo nepravilno parjenje baz, s posledično motnjo v sintezi DNA. S tem se dramatično poveča stopnja mutacij in genetska nestabilnost (86, 87). ITPA jim s pretvorbo v mono in difosfatne oblike prepreči vgradnjo v DNA ali RNA.

Gen, ki kodira encim ITPA, leži na kratki ročici kromosoma 20p13. Dolg je približno 13 kb in je sestavljen iz 8 eksonov (87). Encim se nahaja v citosolu mnogih tkiv (eritrociti, levkociti, srce, jetra, endokrine žleze) (88) v homodimerni obliki. Za maksimalno delovanje potrebuje  $Mg^{2+}$  in  $Mn^{2+}$  ione ter ditiotreitol (89). Aktivnost encima v populaciji kaže bimodalno distribucijo (90), katere vzrok je obstoj normalnega (aktivnega) in mutiranega (neaktivnega) alela. Aktivnost je prisotna le v obliki dimera z dvema normalnima podenotama (89), ki sta pomembni za katalitično delovanje preko alosteričnega regulatornega mehanizma (91).

#### 1.3.3.1 Polimorfizmi v genu za ITPA

Za zmanjšano ali odsotno aktivnost encima so odgovorni polimorfizmi v genu, ki ga kodira. Odkritih je bilo več SNP-jev, med katerimi sta dva povezana z zmanjšano aktivnostjo encima ITPA: 94C>A in IVS2+21A>C (34). Nedavno so odkrili še en polimorfizem, 97 T>C, ki leži blizu mesta pogostega polimorfizma 94 C>A, s prav tako podobno vrednostjo aktivnosti encima (92). Prva alelna različica, 94C>A, se nahaja na

eksonu 2 in povzroči, da se na mestu 32 aminokislina prolin zamenja z aminokislino treonin (Pro32Thr) (93) (slika 9), kar pri heterozigotih za ta polimorfizem zmanjša aktivnost encima na 22,5% aktivnosti divjega tipa, pri homozigotnih osebkih pa jo izniči (84, 90). Druga različica, IVS2+21A>C, se nahaja blizu izrezovalnega mesta na intronu 2 (93). Pri heterozigotih za IVS2+21A>C ima nastali protein še 60% aktivnost divjega tipa (94), homozigoti pa imajo aktivnost podobno heterozigotom za 94C>A (88). Kombinirani heterozigoti (94 C>A / IVS2+21 A>C) imajo le še 10% aktivnost encima v primerjavi z divjim tipom (94).



**Slika 9: Mesto gena ITPA na kromosomu 20.** (Prirejeno po (95))  
Označena sta polimorfizma 94C>A in IVS2+21A>C.

Encimska aktivnost se pomembno razlikuje med spoloma, s 17-20 % višjo aktivnostjo divjega tipa pri moških (96) ter med različnimi populacijami. Frekvenca skupine z nizko aktivnostjo ITPA je v kavkazijski populaciji (heterozigot 94C>A ali IVS2+21A>C) približno 11-35% (90). Polimorfizem 94C>A se med populacijami redkeje pojavlja, pri čemer je najmanjša zastopanost pri prebivalcih srednje in južne Amerike (1-2 %) ter najvišja v azijski populaciji (11-19 %), medtem ko je pojavnost v kavkazijski rasi 7% s frekvenco od 0,038 – 0,098 (88, 97) ter 13% za genotip IVS2+21 A>C s frekvenco 0,131-0,177 (96). Iz rezultatov raziskav je znano tudi, da ima azijska populacija višjo frekvenco polimorfizma ITPA v primerjavi s frekvenco polimorfizma za TPMT (88).

Različice ITPA ne vplivajo na vezavo substrata v katalitično mesto. Le v primeru kombinacije 94C>A / IVS2+21A>C je afiniteta do naravnega substrata signifikantno zmanjšana (92). Pro32 leži oddaljen od aktivnega mesta encima, na zanki, ki povezuje vijačnico  $\alpha 1$  in  $\beta$ -strukturo 2 (91). Zamenjava aminokislina naj bi povzročila konformacijo proteina (motnjo v zvitju), ki je bolj podvržen k razgradnji (33) in motnjo v alosteričnem mehanizmu med obema podenotama encima (91).

### ***Vpliv polimorfizmov ITPA na zdravljenje ALL***

V primeru zmanjšane aktivnosti ITPA se poveča koncentracija ITP, dITP, XTP in dXTP, vendar za ta pojav ni znane patološke povezave, razen njihove abnormalne akumulacije v eritrocitih (85). Kljub temu bi bila lahko visoka koncentracija teh produktov škodljiva v primerih celičnega stresa (33). Ker encim ITPA sodeluje tudi pri katabolizmu tiopurinov v terapiji ALL, bi se v tem primeru poleg endogenih nekanoničnih nukleozidnih trifosfatov, akumulirali tudi 6-MP metaboliti, 6-TITP-ji, ki se naprej pretvarjajo v 6-MMPN pod vplivom TPMT. Zato pri zdravljenju s tiopurini obstaja možnost, da zmanjšana aktivnost tega encima vodi v toksičnost tiopurinov (90).

Vpliv ITPA na nastanek neželenih učinkov 6-MP še ni povsem jasen. Polimorfizem 94C>A je pri terapiji s 6-MP povezan z od odmerka neodvisnimi neželenimi učinki, ki se pojavljajo tudi pri heterozigotnem tipu TPMT encima (98). Različne študije navajajo, da od 10 do 30 % pacientov ne prenaša tiopurinov zaradi neželenih učinkov, ki niso povezani z mielotoksičnostjo, kot na primer gripi podobni simptomi, slabost, bruhanje, hepatotoksičnost, pankreatitis in srbečica (88). Gripi podobne simptome, hepatotoksičnost, pankreatitis in srbečico povezujejo s polimorfizmom ITPA 94C>A (92). Pri pacientih z zmanjšano aktivnostjo encima ITPA 94C>A ugotavljajo, da je večja tudi pojavnost febrilne nevtropenije, predvsem pri tistih, ki imajo terapijo prilagojeno na genotip TPMT. Vzrok višje frekvence febrilne nevtropenije bi bil lahko zaradi povišane koncentracije MMPN, ki v primeru kumulacije v celici povzročajo citotoksične učinke (99). Polimorfizem IVS2+21A>C naj bi imel, po nekaterih raziskavah, manjši vpliv na ITPA aktivnost v primerjavi s 94C>A. 60% aktivnost encima, v primerjavi z divjim tipom, naj bi bila pri heterozigotih (87), dovolj za preprečitev potencialnih toksičnih učinkov TITP (35). Po drugi strani pa ga druge raziskave povezujejo s pojavom trombopenije (92). Rezultati o vplivu teh alelnih različic, so si med seboj nasprotujoči in do danes še ni zaključkov glede njunega vpliva. ITPA in TPMT skupaj vplivata le na 27% hematoloških toksičnih neželenih učinkov, kar nakazuje, da je za zmanjšanje toksičnih učinkov potrebno raziskati še druge faktorje.

## 2 NAMEN DELA

Da bi lahko zmanjšali ali preprečili pojavnost toksičnih učinkov, povezanih s terapijo 6-MP, moramo poiskati dejavnike, ki na te toksične učinke vplivajo. Ko poznamo vplive, lahko **odmerek** zdravila **prilagodimo posameznemu bolniku** in s tem zmanjšamo možnost pojavljanja toksičnih učinkov ter tako lažje povečamo uspešnost terapije. Ti vplivi, poleg polimorfizmov v genu za TPMT, do danes še niso jasni in/ali znani. Vplive polimorfizmov v genu za ITPA je preiskovalo že veliko raziskovalnih skupin, vendar do danes še ni končnih zaključkov. V fazi raziskovanja je tudi vpliv SAM-a in faktorjev, ki bi lahko vplivali na njegovo razpoložljivost v celici. Z diplomsko nalogo bomo preverili vpliv polimorfizmov v genu za ITPA in GNMT na pojavnost toksičnih učinkov 6-MP v fazi nadaljevalnega zdravljenja pri pediatričnih bolnikih z ALL.

1. Preveriti želimo hipotezo, da polimorfizma v genu za encim ITPA, 94C>A in IVS2+21A>C, ki zmanjšata aktivnost encima, povečata verjetnost za pojav toksičnih učinkov 6-MP pri terapiji ALL v pediatrični populaciji. Potrditev hipoteze bi lahko, glede na genotip ITPA in TPMT, prispevala k lažji prilagoditvi terapije za posameznega pacienta z namenom zmanjšati verjetnost pojava toksičnih učinkov oziroma zapletov pri terapiji.
2. Nadalje bomo preverjali še hipotezo, da polimorfizem encima GNMT 1289 C>T vpliva na pojavnost toksičnih učinkov. To hipotezo bomo preverjali s predpostavko, da ta polimorfizem spremeni ravnovesje SAM:SAH ter s tem poveča znotrajcelično razpoložljivost SAM-a v tolikšni meri, da bi SAM povečal stabilnost in aktivnost encima TPMT, s posledičnim zmanjšanjem toksičnih učinkov. Potrditev te hipoteze bi lahko vplivala na spremenjen režim prilagajanja odmerkov 6-MP pri bolnikih s polimorfizmom TPMT\*3A ali \*3C in GNMT 1289C>T.

Hipotezi bomo preverili z metodo TaqMan<sup>®</sup> alelne diskriminacije, s katero bomo detektirali polimorfizme v izbranih genih bolnikov z ALL. Pridobljene podatke bomo, v povezavi z arhivskimi podatki zdravstvenih kartotek bolnikov o poteku terapije s 6-MP pri otrocih z ALL, statistično ovrednotili. V samem začetku pa bomo najprej preverili in primerjali frekvence pojavljanja preučevanih polimorfizmov pri bolnikih z ALL in zdravih kontrolah ter jih nato primerjali še s frekvenco pojavljanja v svetovnih populacijah.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 303 pediatričnih bolnikov, ki so se zdravili za akutno limfoblastno levkemijo in 183 zdravih prostovoljcev, ki predstavljajo kontrolno skupino.

#### Skupina bolnikov

Skupino bolnikov predstavljajo otroci in mladostniki stari do 17 let, ki so se v obdobju 1970 – 2005 zdravili za ALL na Pediatrični kliniki v Ljubljani. Med njimi je 142 (46,9 %) dečkov in 161 (53,1 %) deklic. Otroci so bili ob diagnozi stari v povprečju  $6 \pm 4,3$  let, med katerimi je najmlajši bolnik star 2,4 meseca. Otroci so bili zdravljeni po različnih protokolih (preglednica II), ki so opisani na strani 6. Za enega otroka protokol zdravljenja ni znan.

#### Preglednica II: Število in odstotek bolnikov po protokolih.

Protokol	število otrok	%
POG	88	29,0
ALL-BFM 83	34	11,2
ALL-BFM 86	54	17,8
ALL-BFM 90	59	19,5
ALL-BFM 95	55	18,2
ALL IC BFM 2002	12	4,3

V vseh protokolih, v fazi nadaljevalnega zdravljenja, bolniki v peroralni obliki dnevno jemljejo 6-MP ( $50\text{mg}/\text{m}^2$ ) in tedensko metotreksat ( $20\text{mg}/\text{m}^2$ ), brez prilagoditve terapije 6-MP na genotip TPMT. Odmerki 6-MP so bili preračunani glede na bolnikovo telesno površino in tekom zdravljenja prilagojeni na število levkocitov z želenim številom 2000 – 3000 levkocitov/ $\mu\text{L}$ .

#### Kontrolna skupina

Kontrolno skupino predstavljajo zdravi odrasli. Med njimi je 93 (50,8%) moških in 87 (47,5 %) žensk, za 3 osebe (1,6 %) podatka o spolu nimamo. Povprečna starost skupine je  $23 \pm 5$  let.

## 3.2 VZORCI

Vzorci skupine bolnikov so izolati DNA, pridobljeni iz arhivskih vzorcev razmazov kostnega mozga iz Pediatrične klinike Ljubljana. Vzorci kontrolne skupine so izolati DNA iz periferne venske krvi, preostale po rednih analizah sistematskih pregledov študentov Univerze v Ljubljani ter darovalcev, v biokemijskem laboratoriju ZD za študente Univerze v Ljubljani. Od vsakega preiskovanca je bila pridobljena privolitev za sodelovanje v raziskavi. Postopek izolacije DNA je potekal na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani. DNA kontrolnih vzorcev je bila izolirana po metodi z izsoljevanjem, prirejeni po postopku, ki so ga opisali Miller in sod. (100). Vzorci so bili hranjeni v skrinji, pri temperaturi  $-80^{\circ}\text{C}$  oziroma pri temperaturi  $-20^{\circ}\text{C}$  med raziskovalnim delom.

## 3.3 APARATURE, REAGENTI

- Centrifuga z vrtinčastim mešalom Combi – Spin FVL-2400 N (Biosan),
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica),
- PCR analizator Lightcycler<sup>®</sup> 480 II (Roche),
- pipete: avtomatska elektronska (Transferpette<sup>®</sup>), polavtomatske pipete: 0,1-2,5  $\mu\text{L}$ ; 0,5-10  $\mu\text{L}$ ; 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ ; 100-1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf),
- Plastične epruvete: 0,5 mL; 1,5 mL (SARSTEDT),
- nastavki za pipete,
- parni sterilizator avtoklav (Steriltechnik AG),
- nanodrop ND-1000 Spektrofotometer (NanoDrop technologies Inc.),
- PCR ploščice Lightcycler<sup>®</sup> microwell 480 (Roche),
- folija Lightcycler<sup>®</sup> za zaščito,
- zaščitne rokavice iz lateksa (Kimtech),
- PCR univerzalna zmes 5x HOT FIREPol<sup>®</sup> Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne),
- TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix,
- Analizna mešanica za genotipizacijo (TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assay mix):
  - ITPA 94 C>A part number: 4351379, lot number: C\_27465000\_10
  - ITPA IVS2+21 A>C part number: 4351379, lot number: C\_29168507\_10
  - GNMT 1289 C>T lot number: C\_11425842\_10
- avtoklavirana ultra čista voda

### 3.4 MERJENJE KONCENTRACIJE DNA

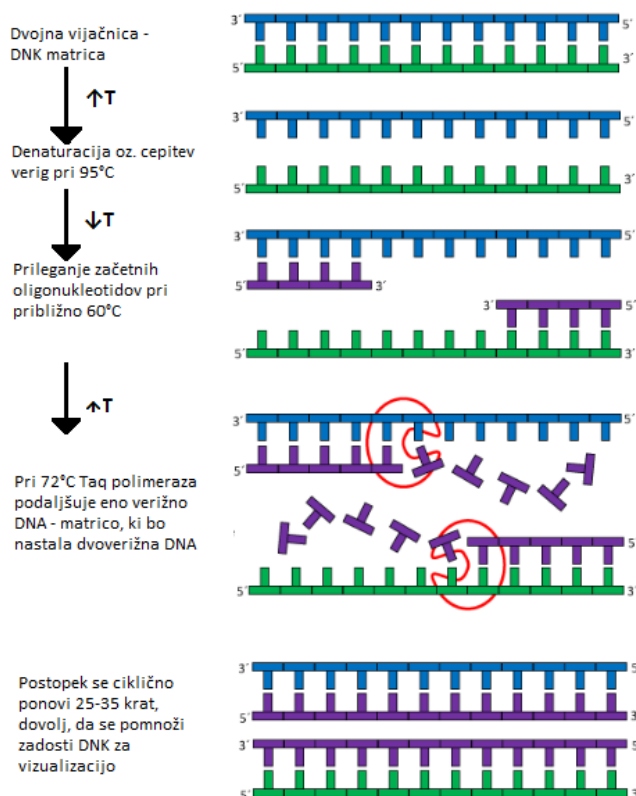
Za izvedbo genotipizacije smo potrebovali 10 ng očiščene DNA, saj za homogene rezultate TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays protokol priporoča, da so na isti ploščici vzorci z enako koncentracijo, ki vsebujejo 1-20 ng očiščene DNA (101). Vzorcem smo spektrofotometrično na spektrofotometru NanoDrop izmerili koncentracijo DNA in jih redčili na 4 µg/mL. Nekateri vzorci so imeli zelo nizko vsebnost DNA, kar je vplivalo na kvaliteto rezultatov in pripravo zmesi za genotipizacijo.

### 3.5 GENOTIPIZACIJA

#### 3.5.1 PCR v realnem času

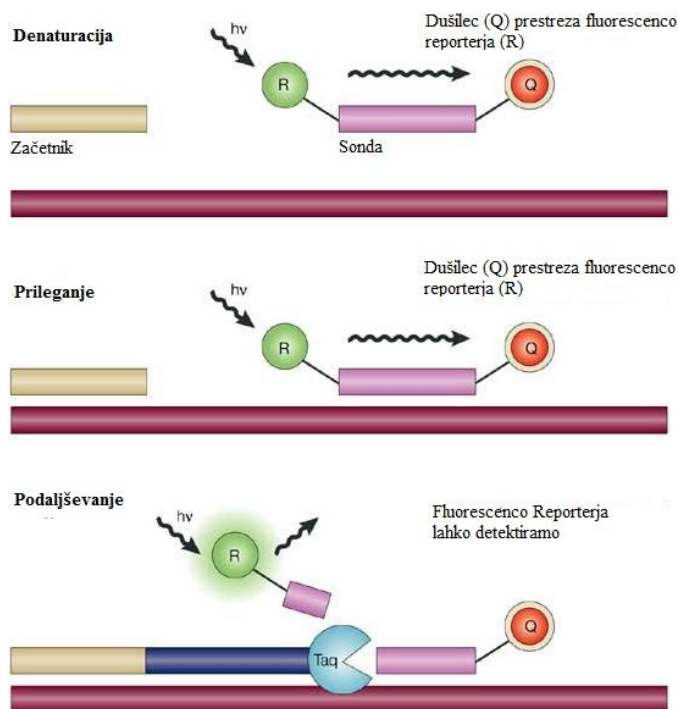
Tehnologija verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času je nadgradnja klasičnega PCR-ja (slika 10), ki združuje pomnoževanje določenega odseka DNA ter hkratno detekcijo produktov, s kontinuiranim merjenjem fluorescence v eksponentni fazi med samim potekom reakcije (103). Načinov detekcije PCR produktov je več. V diplomski nalogi smo uporabljali specifičen način detekcije, kjer fluorescenco oddajajo različna fluorescentna barvila, vezana na hidrolizirajočo sondo.

Sonda je oligonukleotid, ki se veže na tarčno zaporedje znotraj odseka, ki ga pomnožujemo, a je brez sposobnosti podaljševanja. Na oligonukleotidu z barvilom, ki oddaja fluorescenco (donorski fluorofor) je pripet še akceptor, ki pri intaktni sondi duši (absorbira) fluorescenco donorskega barvila. V fazi prileganja se sonda veže na določeno zaporedje (103). Dokler je sonda intaktna fluorescence ni, saj dušilec prestra fluorescenco reporterja s fluorescenčnim resonančnim prenosom energije (FRET tehnologija).



**Slika 10: Shematični prikaz klasične PCR reakcije.** (Prirejeno po (102))

V fazi podaljševanja Taq polimeraza cepi sondo, zato donorsko barvilo fluorescira (104) (slika 11).

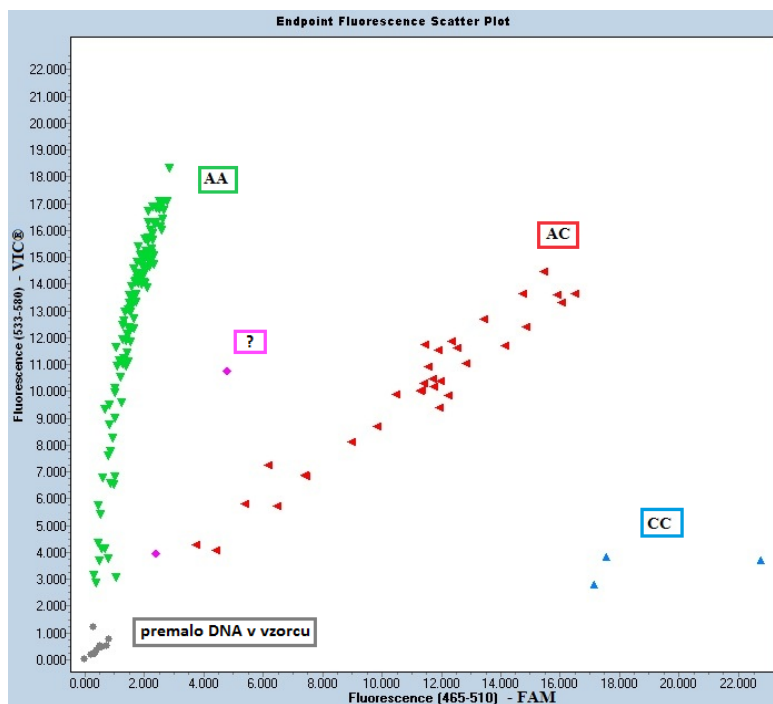


Slika 11: Shematični prikaz metode TaqMan®. (Prirejeno po (105)).

### 3.5.2 TaqMan® alelna diskriminacija

Z alelna diskriminacijo detektiramo različne oblike istega gena, ki se razlikujejo v nukleotidni zamenjavi, inserciji ali deleciji (106). Alelna diskriminacija je z uporabo metode 5' Nukleazne aktivnosti s fluorogenimi sondami hitra in občutljiva metoda za detekcijo znanih mutacij in polimorfizmov. Metoda v enem koraku združuje reakcijo PCR in detekcijo mutacije, z uporabo dveh specifičnih TaqMan sond, eno za vsak alel (107). Sonde se med seboj razlikujeta v nukleotidnem zaporedju, tako da se ena prilega zaporedju divjega tipa alela, druga pa zaporedju mutiranega alela. Pri našem delu smo uporabili sondo z barvilom FAM<sup>TM</sup> (6-karboksifluorescein), ki je kovalentno vezano na 5' koncu ene sonde za detekcijo alela 1 in VIC<sup>®</sup> na drugi za detekcijo alela 2. Fluorescenco obeh reporterjev na vsaki sondi duši TAMRA (6-karboksi-tetrametilrodamin) (108) oziroma NFQ - nefluorescentni dušilec (nonfluorescent quencher). Znatno porast samo FAM<sup>TM</sup> ali VIC<sup>®</sup> fluorescence pomeni, da je osebek homozigoten za alel 1 oz. alel 2, porast obeh barvil pa heterozigoten, saj vsebuje oba alela (106) (slika 12).





**Slika 12: Genotipizacija ITPA IVS2 + 21 A>C.**

AA: divji tip (alel A), CC: mutiran homozigot (alel C), AC: heterozigot,?: ker fluorescenca ne ustreza ostalim trem skupinam program vzorčev genotip ne zna določiti.

### 3.6 POGOJI IN IZVEDBA DELA

Delo smo opravljali v sterilni komori, da smo zmanjšali možnost kontaminacije vzorcev s tujo DNA in s tem tveganje za napačne rezultate. Pred začetkom priprave vzorcev za genotipizacijo, smo zato površino delovne komore očistili s 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ter s 3% raztopino hipoklorita ves material (vsebniki z nastavki za pipete in plastične epruvete, pipete, podstavki), ki smo ga med delom potrebovali. Material je bil predhodno avtoklaviran in očiščen pred vnosom v komoro. Sledila je sterilizacija z UV lučjo za 30 min. Ko je bila komora pripravljena za delo, smo vanjo prinesli še vzorce in reagente. Med delom smo nosili zaščitno haljo in rokavice iz lateksa, ki smo jih pred pričetkom dela očistili s 70% etanolom. Zmes za genotipizacijo smo pripravili iz PCR Master Mixa, TaqMan analizne mešanice in dvakrat destilirane avtoklavirane čiste vode. Sestavo reagentov podaja preglednica III.

**Preglednica III: Sestava reagentov za genotipizacijo z metodo PCR v realnem času.**

Reagent	Sestava
Master Mix Optimizirana mešanica za qPCR (HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HOT FIREPol® DNA Polimeraza</li> <li>reakcijski pufer (5x Probe qPCR buffer )</li> <li>- 15 mM MgCl<sub>2</sub> (1 x PCR raztopina – 3 mM MgCl<sub>2</sub>)</li> <li>- Mešanica dNTP, vključno z dTTP za izboljšano občutljivost in učinkovitost reakcije v primerjavi z dUTP</li> <li>- ROX barvilo (pasivno referenčno barvilo, za normalizacijo fluorescentnega signala reporterja)</li> </ul>
Master Mix Optimizirana mešanica za qPCR (TaqMan® Universal PCR Master Mix)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- AmpliTaq Gold® DNA polimeraza</li> <li>- *AmpErase® UNG,</li> <li>- mešanica dNTP z dUTP</li> <li>- pasivno referenčno barvilo</li> <li>- optimiziran reakcijski pufer</li> </ul>
TaqMan® analzna mešanica (TaqMan® SNP Genotyping Assay)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reportersko barvilo na 5' koncu vsake sonde: VIC® in FAM™</li> <li>- molekula MGB, ki se veže v mali jarek DNA (minor groove binder) in NFQ - nefluorescentni dušilec (nonfluorescent quencher) na 3' koncu vsake sonde</li> </ul>

\* AmpErase® uracil-N-glikozidaza (UNG) je encim, ki prepreči ponovno pomnožitev kontaminiranih »carryover« PCR produktov.

Uporabljali smo tri različne TaqMan® mešanice, za genotipizacijo treh različnih polimorfizmov. Te se razlikujejo v sestavi nukleotidnega zaporedja sond, specifični za analizo določenih polimorfizmov. V preglednici IV so navedeni aleli vsakega polimorfizma, ki ustrezajo barviloma za detekcijo.

**Preglednica IV: TaqMan sonde, ki ustrezajo določenim alelom genov ITPA in GNMT.**

Alel	Barvilo		rs
	FAM	VIC	
ITPA 94C>A IVS2+21A>C	AA	CC	1127354
	CC	AA	7270101
GNMT 1289C>T	TT	CC	10948059

Volumska sestava končne zmesi za genotipizacijo je bila v osnovi kot kaže preglednica V, vendar smo zaradi neenakih koncentracij DNA v vzorcih, spreminjali volumen vode ali vode in vzorcev. Upoštevali smo naslednja razmerja redčitev: 1:5 = HOT FIREPol<sup>®</sup> Probe qPCR Mix Plus : končni volumen reakcijske zmesi, 1:2 = TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix : končni volumen reakcijske zmesi in 1 : 40 = TaqMan analizna mešanica : končni volumen reakcijske zmesi. Končni volumen je bil 5 oz 6 µL.

**Preglednica V: Tri različne volumske sestave reakcijske mešanice za genotipizacijo.**

<b>Komponente za reakcijo GNMT</b>	<b>Volumen za n – vzorcev (µL)</b>
Voda	n x 2,15
MasterMix HOT FIREPol <sup>®</sup>	n x 1,20
TaqMan <sup>®</sup> SNP Genotyping Assay	n x 0,15
Vzorec DNA	2,50
Končni volumen reakcijske zmesi	6,00
<b>Komponente za reakcijo ITPA</b>	<b>Volumen za n – vzorcev (µL)</b>
Voda	n x 1,875
MasterMix HOT FIREPol <sup>®</sup>	n x 1,000
TaqMan <sup>®</sup> SNP Genotyping Assay	n x 0,125
Vzorec DNA	2,000
Končni volumen reakcijske zmesi	5,000
<b>Komponente za reakcijo ITPA</b>	<b>Volumen za n – vzorcev (µL)</b>
Voda	n x 0,35
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix	n x 3,00
TaqMan <sup>®</sup> SNP Genotyping Assay	n x 0,15
Vzorec DNA	2,50
Končni volumen reakcijske zmesi	6,00

Reagente smo do uporabe hranili na ledu v temi, nato smo jih vrnili v skrinjo. Pred začetkom dela smo oba reagenta in vzorce centrifugirali ter reagenta dobro premešali na vortex stresalniku. Analizno zmes smo pripravili v odvisnosti od števila vzorcev po izračunu iz preglednice V. Upoštevali smo izgube pri pipetiranju, zato smo dodali 10% prebitek glede na število vzorcev. Po pripravi in večkrat med samim delom smo analizno zmes premešali. Zmes smo odpipetirali v luknjice PCR ploščice in nadaljevali s pipetiranjem vzorcev. Pred pipetiranjem v luknjice ploščice smo vzorce premešali še s pipeto in v vsako luknjico odpipetirali 1; 2; 2,5 ali 3 µL posameznega vzorca, odvisno od protokola po katerem smo delali. Za zagotavljanje točnosti analize, smo v vsako ploščico vključili slepo kontrolo, za detekcijo morebitne kontaminacije ali lažno pozitivnih

rezultatov. V namen negativne ali slepe kontrole smo namesto vzorca odpipetirali vodo, ki smo jo uporabili za pripravo zmesi. Število slepih kontrol smo prilagodili številu vzorcev in številu različnih sond na eni ploščici. Pri genotipizaciji polimorfizma ITPA smo genotipizirali oba polimorfizma na isti ploščici na enakih vzorcih. Zaradi težav z določitvijo genotipa smo pri nekaterih vzorcih vključili še pozitivne kontrole, in sicer vzorce z znanim genotipom z visoko fluorescenco, enega za vsak genotip. Nekaterim vzorcem nam kljub temu ni uspelo določiti genotipa za oba polimorfizma. Razlog bi bil lahko v izvedbi dela ali v nizki koncentraciji DNA in slabi kvaliteti vzorcev, zaradi njihove dolgotrajne hrambe in večkratne uporabe. Po končanem pipetiranju smo ploščico zatesnili s samolepilno folijo, ki preprečuje kontaminacijo in izhlapevanje mešanice. Za tesnjenje smo uporabili za to namenjeno plastično kartico (Sealing Foil Applicator). Ko smo reakcijsko zmes zaščitili, smo ploščico centrifugirali 3 min pri 1900 vrtljajev na min (rpm), da smo se znebili motečih mehurčkov. Vzorce smo genotipizirali z metodo TaqMan® na napravi Lightcycler® 480. V programu smo ustvarili predlogo za genotipizacijo, ki smo jo uporabljali. Nastavili smo naslednje parametre: detekcijski format z izbiro (ekscitacijskega in emisijskega) filtra: Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe, reakcijski volumen in velikost ploščice ter program, ki je podan v preglednici VI.

#### **Preglednica VI: Program genotipizacije**

<b>PROGRAM 1</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>ČAS</b>	<b>CIKEL</b>
Začetna denaturacija	95	15 min	1 cikel – na začetku
Podaljševanje in polimerizacija	95	20 s	45 ciklov
	60	1 min	
ohlajanje	40	10 min	1 cikel – na koncu
<b>PROGRAM 2</b>			
Inkubacija UNG	50	2 min	/
Aktivacija AmpliTaq Gold polimeraze	95	10min	/
Začetna denaturacija	95	15 s	1 cikel – na začetku
Podaljševanje in polimerizacija	60	1 min	45 ciklov
ohlajanje	40	10 min	1 cikel – na koncu

### 3.7 STATISTIČNA ANALIZA

Podatke smo statistično ovrednotili s Fisher eksaktnim dvostranskim testom in s programom IBM SPSS Statistics 20, z uporabo binarne logistične regresije. Vrednost verjetnosti  $p < 0,05$  smo upoštevali kot statistično pomembno, pri 95% intervalu zaupanja ( $\alpha = 0,05$ ). Preverili smo tudi ali se polimorfizmi med skupinama bolnikov in kontrol statistično razlikujejo in če spadajo v Hardy-Weinbergovo ravnovesje (HWE). Če polimorfizmi ne bi bili v skladu s HWE, ugotovitev, v povezavi z zdravljenjem s 6-MP, ne bi mogli uporabiti za splošno populacijo.

#### 3.7.1 Hardy-Weinbergovo načelo

HWE je načelo, ki pravi, da je v neskončno veliki populaciji, kjer so paritve povsem naključne, kjer ni mutacij, migracij in naravne selekcije, alelna frekvenca in frekvenca genotipov v ravnotežju in se med generacijami ne spreminja. Frekvenco genotipov zato lahko opišemo kot funkcijo alelne frekvence. S testiranjem HWE predvidevamo, da genotipi predstavljajo naključen vzorec iz populacije in da niso povezani z nastankom bolezni (109). Za izračun HWE smo izračunali **opazovane alelne frekvence** in iz njih **pričakovane vrednosti** genotipov po naslednjih enačbah:

##### Enačbi 1: Opazovana frekvenca posameznega alela v populaciji

$$p = \frac{(2n_{AA} + n_{Aa})}{2N}$$

p...frekvenca alela **A** v populaciji

$$q = \frac{(2n_{aa} + n_{Aa})}{2N}$$

q...frekvenca alela **a** v populaciji

N...št. vseh preiskovancev

##### Enačbe 2: Pričakovano število posameznikov z določenim genotipom.

$$AA = p^2 N$$

n...št. posameznikov z določenim genotipom:

**AA**-divji tip, **Aa**-heterozigot, **aa**-mutiran

$$Aa = 2pq N$$

homozigot

$$aa = q^2 N$$

S Fisher eksaktnim, dvostranskim testom, smo nato preverili ali prihaja do odstopanj od ravnotežja. Če je vrednosti  $p > 0,05$ , skupina spada v HWE.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 POGOSTOST POLIMORFIZMOV

#### 4.1.1 ITPA 94C>A IN ITPA IVS2+21 A>C

Podatke polimorfizmov gena ITPA 94C>A in IVS2+21A>C zdravih kontrol in bolnikov, prikazujeta preglednici VII in VIII. V kontrolni skupini, kot tudi v skupini bolnikov smo našli največ homozigotov z divjim tipom (dt) alelov (CC in AA), veliko manj heterozigotov (CA in AC), mutiranih homozigotov (AA in CC) pa v kontrolni skupini ni bilo. V skupini bolnikov smo, z razliko od kontrolne skupine, pri obeh polimorfizmih našli mutirane homozigote, in sicer dva 94AA in sedem IVS2+21CC. Za dve kontroli pri vsakem polimorfizmu nam genotipa ni uspelo določiti.

Po izračunu pričakovanih vrednosti, z uporabo enačb iz poglavja 3.7, smo s Fisher eksaktnim testom ugotovili, da se pri obeh polimorfizmih opazovane vrednosti statistično značilno ne razlikujejo od pričakovanih, saj so vrednosti večje od  $\alpha=0,05$  (94C>A:  $p=0,879$  in IVS2+21A>C:  $p=0,229$ ). Iz rezultatov lahko sklepamo, da kontrolni skupini spadata v HWE.

**Preglednica VII: Rezultati opazovanih in pričakovanih vrednosti frekvenc genotipa ITPA 94C>A**

KONTROLE ITPA 94C>A	OPAZOVANE VREDNOSTI		PRIČAKOVANE VREDNOSTI	
	frekvenca genotipov (%)	n	frekvenca genotipov (%)	n
CC	85,64	155	86,19	156
CA	14,36	26	13,26	24
AA	0	0	0,55	1
Skupaj	100	181	100	181
BOLNIKI ITPA 94C>A	OPAZOVANE VREDNOSTI		PRIČAKOVANE VREDNOSTI	
	frekvenca genotipov (%)	n	frekvenca genotipov (%)	n
CC	87,13	264	87,13	263
CA	12,21	37	12,54	38
AA	0,66	2	0,33	1
Skupaj	100	303	100	302

n: število oseb z določenim genotipom

**Preglednica VIII: Rezultati opazovanih in pričakovanih vrednosti frekvenc genotipa ITPA IVS2+21A>C.**

KONTROLE ITPA IVS2 + 21A>C	OPAZOVANE VREDNOSTI		PRIČAKOVANE VREDNOSTI	
	frekvenca genotipov (%)	n	frekvenca genotipov (%)	n
AA	76,24	138	77,47	141
AC	23,76	43	20,88	38
CC	0	0	1,65	3
Skupaj	100	181	100	182
BOLNIKI ITPA IVS2 + 21A>C	OPAZOVANE VREDNOSTI		PRIČAKOVANE VREDNOSTI	
	frekvenca genotipov (%)	n	frekvenca genotipov (%)	n
AA	75,91	230	75,49	228
AC	21,78	66	22,85	69
CC	2,31	7	1,66	5
Skupaj	100	303	100	302

n: število oseb z določenim genotipom

Opazovane vrednosti pri skupini bolnikov se prav tako statistično značilno ne razlikujejo od pričakovanih (94C>A:  $p=1,000$  in IVS2+21A>C:  $p=0,824$ ;  $\alpha=0,05$ ). Pri primerjavi podatkov bolnikov in kontrol ugotovimo, da se vrednosti statistično značilno ne razlikujejo ( $p=0,757$  in  $p=0,551$ ), zato tudi ta skupina spada v HWE. Vzorec je reprezentativen, zato podatke lahko uporabimo za preučevanje vplivov polimorfizmov encima ITPA na izid terapije s 6-MP.

**Pogostost v primerjavi z drugimi raziskavami**

Iz podatkov naše kontrolne skupine smo izračunali alelni frekvenci za oba polimorfizma in ju primerjali z raziskavami drugih raziskovalnih skupin, ki jih prikazuje preglednica IX.

**Preglednica IX: Primerjava alelnih frekvenc svetovne populacije**

Skupina ljudi	Alelna frekvenca			
	ITPA 94C>A		IVS2+21A>C	
	C	A	A	C
Kitajci (110)	0,85	0,15	0,87	0,13
Japonci (111)	0,865	0,135	0	0
V Indijci (110)	0,89	0,11	/	/
Britanski kavkazijci (110)	0,93	0,07	/	/
Slovenci	0,93	0,07	0,88	0,12
S EU (85)	0,94	0,06	0,87	0,13
Ameriški kavkazijci (97)	0,94	0,06	/	/
Italijani (112), Nizozemci (113)	0,95	0,05	0,89	0,11
Afričani (110)	0,95	0,05	/	/
Bolgari (91)	0,96	0,04	/	/

Alelni frekvenci za homozogotni alel q(A) in q(C), pri polimorfizmih 94C>A in IVS2+21A>C, sta pričakovano nizki in znašata 0,07 ter 0,12. Naši rezultati so podobni rezultatom drugih študij na kavkazijski rasi evropske populacije. Veliko višjo frekvenco polimorfizma 94C>A lahko opazimo v azijski populaciji, še posebno pri Japoncih in Kitajcih.

#### 4.1.2 GNMT 1289 C>T

Za polimorfizem GNMT 1289 C>T je bilo v skupini bolnikov največ mutiranih heterozigotov (CT) tem sledijo homozigoti z divjim tipom alelov (CC) in nekaj manj mutiranih homozigotov (TT). Opazovane vrednosti se statistično značilno ne razlikujejo od pričakovanih ( $p=0,596$ ). Frekvence genotipov bolnikov smo primerjali s podatki kontrol iz predhodnih raziskav na vzorcih iste kontrolne skupine kot za ITPA (114), kjer so ugotovili, da polimorfizem GNMT 1289C>T te skupine spada v HWE ( $p=0,966$ ;  $\alpha=0,05$ ). V naši skupini bolnikov smo dobili nekoliko višjo vrednost za divji tip, vendar med skupinama ni pomembnih statističnih razlik ( $p=0,856$ ). Polimorfizem bolnikov spada v HWE, zato je tudi ta vzorec reprezentativen in ga lahko uporabimo za našo študijo. Rezultati so zbrani v preglednici X.

**Preglednica X: Rezultati opazovanih in pričakovanih vrednosti frekvenc genotipa GNMT 1289C>T**

BOLNIKI GNMT 1289C>T	OPAZOVANE VREDNOSTI		PRIČAKOVANE VREDNOSTI	
	frekvenca genotipov (%)	n	frekvenca genotipov (%)	n
CC	28,81	87	26,73	81
CT	45,70	138	49,83	151
TT	25,50	77	23,43	71
Skupaj	100	302	100	303
KONTROLE GNMT 1289C>A	OPAZOVANE VREDNOSTI		PRIČAKOVANE VREDNOSTI	
	frekvenca genotipov (%)	n	frekvenca genotipov (%)	n
CC	25,49	52	25,00	51
CT	48,53	99	50,00	102
TT	25,98	53	25,00	51
Skupaj	100	204	100	204

n: število oseb z določenim genotipom



## 4.2 POLIMORFIZMI V POVEZAVI Z IZIDOM ZDRAVLJENJA

S statistično analizo smo retrospektivno preverili vplive polimorfizmov ITPA in GNMT na pojavljanje toksičnih učinkov, relapsa bolezni, v fazi vzdrževalnega zdravljenja pediatričnih bolnikov z ALL in petletno preživetje brez relapsa. Iz zdravstvenih kartotek bolnikov smo iz te faze pridobili podatke o odmerku 6-MP, relapsu, časa do relapsa in pojavih toksičnih učinkov: supresija kostnega mozga (SKM), stomatitis, sepsa/infekcija, febrilna nevtropenija, hepatotoksičnost, aseptična nekroza kolkov in sekundarni tumor. Za pomembno zmanjšanje odmerka se je štelo zmanjšanje odmerka za več kot 10% v obdobju daljšem od treh mesecev. Toksični učinek je bil definiran kot dogodek, ki je povzročil eno od naštetega: prekinitev terapije za obdobje daljše od enega tedna, znižanje odmerka za več kot 10% za obdobje daljše od treh mesecev ali hospitalizacija bolnika. Hematotoksičnost oziroma SKM ustreza levkopeniji stopnje 3 in 4, stomatitis stopnje 2 in 3, infekcija stopnje 3 in 4 in sekundarni tumor stopnje 4 (115). Za vpliv na relaps smo upoštevali le bolnike, za katere smo imeli podatke za **vsaj 3 leta po postavitvi diagnoze**. V analizo smo poleg naših podatkov genotipizacije za ITPA (94C>A in IVS2+21A>C) in GNMT (1289C>T), vključili še podatke o polimorfizmih MTHFR (677C>T in 1298A>C) in TPMT (460G>A in 719A>G) oz. njegovi alelni različici TPMT\*3A (460G>A in 719A>G) in \*3C (719A>G). S TPMT\*3 bomo označevali polimorfizem pri katerem bo prisoten vsaj en mutiran alel alelnih različic TPMT\*3A ali TPMT\*3C in s TPMT\*1 divji tip gena. Polimorfizme smo analizirali z ozirom na starost, spol in protokole zdravljenja. Podatke genotipizacije TPMT in MTHFR smo pridobili iz predhodne študije (115) na istih vzorcih.

### 4.2.1 ITPA 94C>A in IVS2+21A>C

Polimorfizma v genu za ITPA smo analizirali posamezno in v kombinaciji s TPMT\*1 in TPMT\*3, da bi preverili če kombinacija polimorfizmov vpliva na rezultat. Preverili smo vpliv prisotnosti divjega tipa in vsaj enega mutiranega alela (**mut**) ITPA (94C>A in/ali IVS2+21A>C) in posameznega polimorfizma ITPA ter njihove kombinacije s TPMT\*1 in TPMT\*3 na vse toksične učinke in relaps bolezni. Izračunali smo tudi petletno preživetje brez dogodka, glede na čas do relapsa, z ozirom na genotip ITPA. Za to analizo smo izključili vse bolnike, pri katerih nismo imeli podatka o relapsu za prvih 5 let od diagnoze. Dogodek je bil definiran kot prisotnost sepse/infekcije in/ali relaps in/ali smrt. Analizo smo naredili z metodo Kaplan-Meier. Glede na rezultate objavljenih študij, ki so si med seboj

sicer nasprotujoči, smo pričakovali vplive pri levkopeniji, febrilni nevtropeniji in hepatotoksičnosti. Tanaka in sod. (116) te vplive razlagajo z domnevo, da bolniki z deficitno aktivnostjo ITPA ne bi bili zmožni pretvoriti 6-TITP v 6-TIMP, zato bi se 6-TITP-ji akumulirali v celicah in vplivali na razvoj levkopenije. Zaradi zakasnjene defosforilacije 6-TITP v 6-TIMP bi se akumulirali tudi 6-MeTITP-ji, ki nastanejo iz 6-TITP s TPMT katalizirano reakcijo, in povzročali hepatotoksičnost. Po pričakovanju smo statistično značilen vpliv dobili pri **febrilni nevtropeniji**, medtem ko je bil rezultat vpliva divjega tipa gena ITPA na **relaps** nepričakovan. Vplivov polimorfizmov na ostale toksične učinke nismo našli. Petletno preživetje brez dogodka je bilo boljše pri bolnikih z vsaj enim mutiranim alelom ITPA. Rezultate prikazujeta preglednici XI in XII.

**Preglednica XI: Povezava med pojavljanjem toksičnih učinkov v vzdrževalni fazi zdravljenja in prisotnost polimorfizmov ITPA in TPMT in njihovih kombinacij.**

TOKSIČNI UČINEK	SKM	stomatitis	sepsa/ infekcija	febrilna nevtropenija	hepato- toksičnost
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
ITPA <sup>1</sup>					
dt <sup>2</sup> (N= 192)	25 (13,0)	13 (6,8)	44 (22,9)	6 (3,1)	8 (4,2)
mut <sup>3</sup> (N= 111)	19 (17,1)	6 (5,4)	21 (18,9)	9 (8,1)	3 (2,7)
p	0,426	0,587	0,495	<b>0,068</b>	0,516 <sup>a</sup>
ITPA <sup>1</sup> + TPMT					
dt <sup>1</sup> + TPMT*3 (N=12 )	8 (66,7)	2 (16,7)	6 (50,0)	1 (8,3)	1 (8,3)
mut <sup>2</sup> + TPMT*3 (N=8 )	6 (75,0)	3 (37,5)	5 (62,5)	0	0
p <sup>b</sup>	1,000	0,347	0,670	1,000	1,000
ITPA IVS2+21A>C					
dt <sup>1</sup> (N= 230)	29 (12,6)	14 (6,1)	51 (22,2)	7 (3,0)	11 (4,8)
mut <sup>2</sup> (N= 73)	15 (20,5)	5 (6,8)	14 (19,2)	8 (11,0)	0
p	0,171	0,932	0,783	<b>0,010</b>	0,072 <sup>b</sup>
ITPA IVS2+21A>C + TPMT					
dt <sup>1</sup> + TPMT*3 (N= 13)	9 (69,2)	2 (15,4)	7 (53,8)	1 (7,7)	1 (7,7)
mut <sup>2</sup> + TPMT*3 (N= 7)	5 (71,4)	3 (42,9)	4 (57,1)	0 (0,0)	0 (0,0)
p <sup>b</sup>	1,000	0,290	1,000	1,000	1,000
ITPA IVS2+21A>C + TPMT					
dt <sup>1</sup> + TPMT*1 (N=217)	20 (9,2)	12 (5,5)	44 (20,3)	6 (2,8)	10 (4,6)
mut <sup>2</sup> + TPMT*1 (N= 66)	10 (15,2)	2 (3,0)	10 (15,2)	8 (12,1)	0
p	0,133	0,530 <sup>a</sup>	0,624	<b>0,004</b>	0,124 <sup>b</sup>
ITPA 94A>C					
dt <sup>1</sup> (N= 264)	40 (15,2)	18 (6,8)	58 (22,0)	14 (5,3)	8 (3,0)
mut <sup>2</sup> (N= 39)	4 (10,3)	1 (2,6)	7 (17,9)	1 (2,6)	3 (7,7)
p	0,479	0,347	0,453	0,441	0,163 <sup>b</sup>

**Preglednica XII: Povezava med pojavljanjem toksičnih učinkov v vzdrževalni fazi zdravljenja in prisotnost polimorfizmov ITPA in TPMT in njihovih kombinacij.**

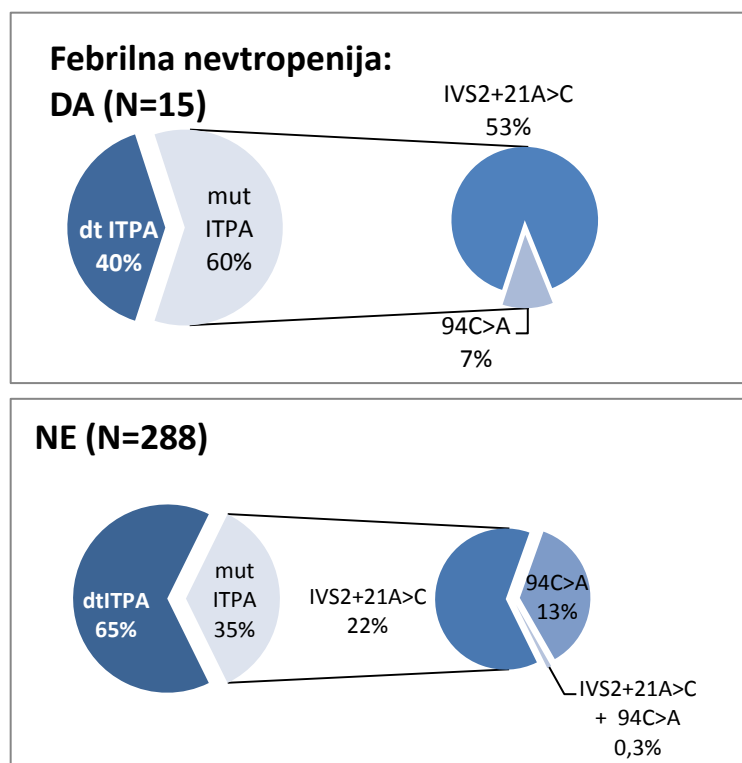
TOKSIČNI UČINEK	aseptična nekroza kolkov	sekundarni tumor	relaps	znižanje doze za >10%
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
ITPA <sup>1</sup>				
dt <sup>2</sup> (N= 192)	6 (3,1)	4 (2,1)	73/181 (40,3)	40 (20,8)
mut <sup>3</sup> (N= 111)	2 (1,8)	1 (0,9)	27/103 (26,2)	22 (19,8)
p <sup>a</sup>	0,271	0,401	0,024 <sup>a</sup>	0,814
ITPA <sup>1</sup> + TPMT				
dt <sup>2</sup> + TPMT*3 (N=12 )	1 (8,3)	0	5/12 (41,7)	6 (50,0)
mut <sup>3</sup> + TPMT*3 (N=8 )	1 (12,5)	0	2/7 (28,6)	4 (50,0)
p <sup>b</sup>	1,000	/	0,808 <sup>a</sup>	1,000
ITPA IVS2+21A>C				
dt (N= 230)	7 (3,0)	5 (2,2)	82/217 (37,8)	48 (20,9)
mut (N= 74)	1 (1,4)	0	18/67 (26,9)	14 (19,2)
p <sup>a</sup>	0,180	0,342 <sup>b</sup>	0,104	0,631
ITPA IVS2+21A>C + TPMT				
dt + TPMT*3 (N= 13)	1 (7,7)	0	5/13 (38,5)	7 (53,8)
mut + TPMT*3 (N= 7)	1 (14,3)	0	2/6 (33,3)	3 (42,9)
p <sup>a</sup>	1,000	/	0,898 <sup>a</sup>	1,000
ITPA 94A>C				
dt <sup>1</sup> (N= 265)	7 (2,7)	4 (1,5)	90/247 (36,4)	54 (20,5)
mut <sup>2</sup> (N= 39)	1 (2,6)	1 (2,6)	10/37 (27,0)	8 (20,5)
p <sup>a</sup>	0,688	0,547	0,332 <sup>a</sup>	0,831

n: število bolnikov s TU; mut: prisotnost vsaj enega mutiranega alela; <sup>1</sup> 94C>A + IVS2+21A>C; <sup>2</sup> kombinacija dt ITPA (94CC in IVS2+21AA); <sup>3</sup> kombinacije polimorfizmov ITPA z vsaj enim od 94C>A in/ali IVS2+21A>C [(CA/AA)+(CA/AC)+(AA/AA)+(CC/AC)+(CC/CC)]; <sup>a</sup> protokoli niso upoštevani zaradi premajhne skupine bolnikov; <sup>b</sup> Fisher eksaktni 2-stranski test.

#### 4.2.1.1 Febrilna nevtropenija

Povečano tveganje za pojav febrilne nevtropenije se je izkazalo v primeru prisotnosti vsaj enega mutiranega alela ITPA (p=0,068). Statistično pomemben vpliv je, izmed polimorfizmov ITPA, predstavljala prisotnost vsaj enega mutiranega alela IVS2+21A>C (**p=0,010**) in ne 94C>A (p=0,442), kot smo sprva pričakovali (slika 13). Vpliv prisotnosti IVS2+21A>C se je še povečal v kombinaciji s TPMT\*1 (**p=0,004**), z največjim tveganjem v **POG** protokolu (**p=0,035**). To nakazuje, da bi lahko zaradi kopičenja 6-TITP-jev posepešeno nastajali njihovi metilirani produkti, za katere je odgovoren encim TPMT. Podobno so tudi Stocco in sod. (99), s primerjanjem rezultatov protokolov s prilagojenim in neprilagojenim odmerkom 6-MP na genotip TPMT, ugotovili, da je skupna pojavnost

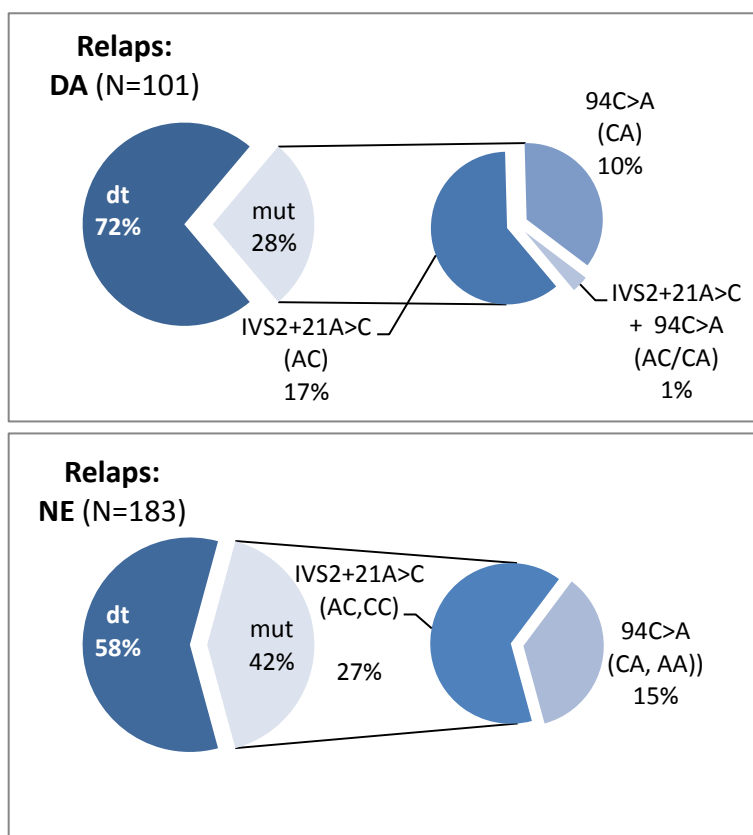
febrilne nevtropenije višja pri skupini bolnikov z mutiranim alelom ITPA, sicer s polimorfizmom 94C>A, ki je bila prilagojena na TPMT genotip. Vplivov polimorfizma IVS2+21A>C niso spremljali. Kljub temu, da niso našli pomembnih vplivov 94C>A na hematopoetsko toksičnost, ugotavljajo, da ITPA pri tem učinku nastopi kot pomemben rizičen faktor, ko je terapija prilagojena na genotip TPMT. Možna razlaga statistično večjega vpliva IVS2+21A>C v primerjavi s 94C>A v naši študiji je lahko zaradi večjega pojavljanja v kavkazijski rasi kot pa 94C>A. To ugotavljajo tudi Hawwa in sod. (117), ki prav tako pri polimorfizmu 94C>A niso našli povezav s hematološko toksičnostjo. Pri bolnikih s prisotnim vsaj enim mutiranim alelom IVS2+21A>C so našli tudi statistično višje vrednosti 6-TGN-jev v eritrocitih ter vpliv na povišano tveganje za trombocitopenijo. Drugih toksičnih učinkov terapije v tej študiji niso spremljali. V drugi študiji, v nasprotju s Hawwa in sod., Stocco in sod. (99) niso našli povezave omenjenega polimorfizma z višjimi vrednostmi 6-TGN-jev v kostnem mozgu, našli pa so statistično višje vrednosti 6-MMPN-jev pri mutiranem tipu ITPA ter vpliv 94C>A na pojavnost febrilne nevtropenije. Tudi Dorababu in sod. (63) so našli vpliv na povečano pojavnost febrilnih epizod pri polimorfizmu 94C>A a ne tudi pri IVS2+21A>C, saj je bila frekvenca pojavljanja v njihovi skupini bolnikov zelo nizka (0,006). Starost, spol in TPMT\*3, v kombinaciji z ITPA, niso predstavljali povečanega tveganja za pojav febrilne nevtropenije.



**Slika 13: Bolniki z ali brez febrilne nevtropenije, glede na genotip ITPA v %.**  
mut: vsaj en mutiran alel, dt: divji tip.

#### 4.2.1.2 Relaps in analiza preživetja

Največja verjetnost relapsa se je, med preučevanimi polimorfizmi, izkazala za bolnike z **divjim tipom** gena ITPA ( $p=0,024$ ). Ta genotip je sicer prisoten tudi pri več kot polovici (59,7%) bolnikov brez relapsa vendar je prisotnost vsaj enega mutiranega alela ITPA, kljub mnogo manjšemu pojavljanju v populaciji v primerjavi z divjim tipom, še vedno precej visoka (73,8%) (slika 14). Preverili smo tudi ali polimorfizem ITPA vpliva na zvišanje odmerka pri skupini bolnikov z relapsom, vendar statistično pomembnega vpliva nismo našli (preglednica XIII, slika 15).

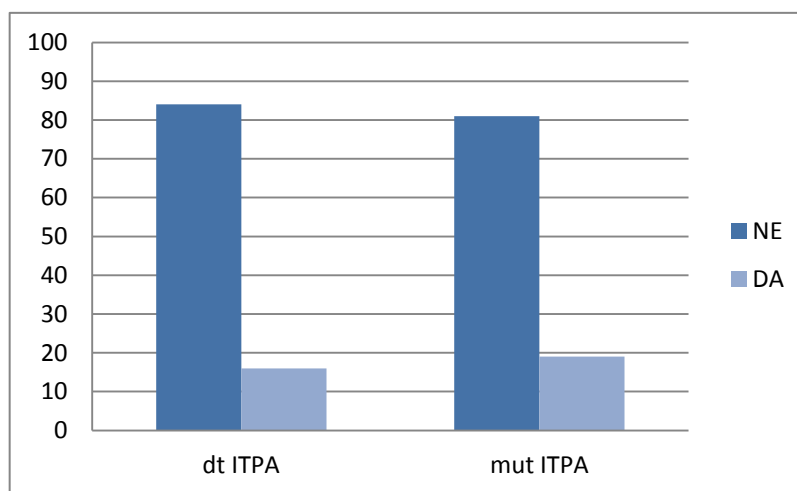


**Slika 14: Bolniki z ali brez relapsa, glede na genotip ITPA v %.**

dt: divji tip; mut: vsaj en mutiran alel (od teh različni genotipi in kombinacije polimorfizmov ITPA, navedeni v oklepajih). Če kombinacija ni narisana, ni prisotna.

### Preglednica XIII: Odmerek pri bolnikih z relapsom

Bolniki z relapsom		
ITPA	Odmerek	
	100%	>100%
dt	56 (83,6)	11 (16,4)
mut	21 (80,8)	5 (19,2)
p	0,574	

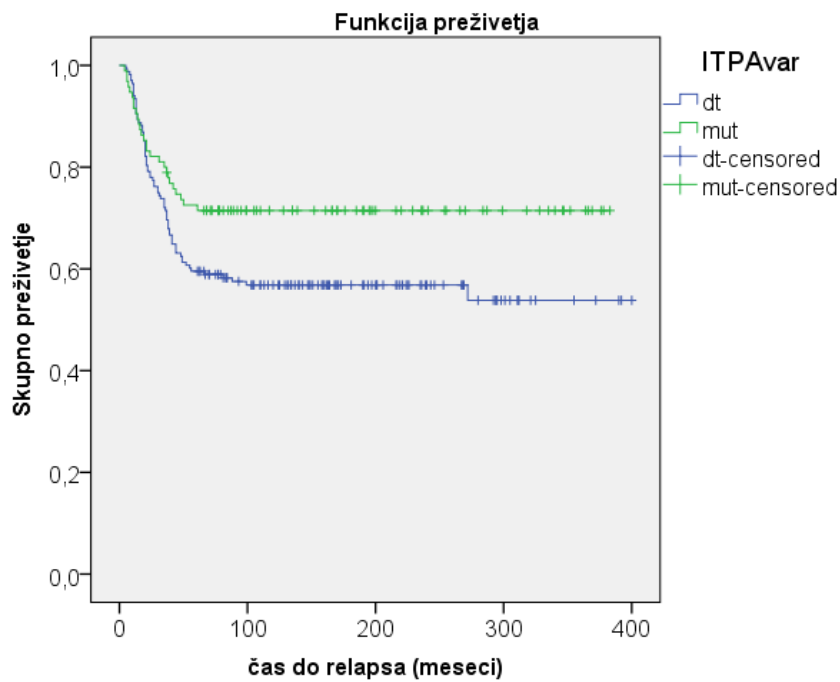


**Slika 15: Zvišanje odmerkov pri bolnikih z relapsom, glede na bolnikov genotip ITPA.**

dt: divji tip ITPA, mut: prisoten vsaj en mutiran alel ITPA.

Tudi Kim in sod. (118), s študijo na Japonski populaciji bolnikov, niso našli vplivov polimorfizma 94C>A na relaps in pojav febrilne nevtropenije, kljub temu da se ta tip polimorfizma v njihovi populaciji pojavlja skoraj trikrat pogosteje kot v kavkazijski rasi, vendar je primerljiv s pogostostjo polimorfizma IVS2+21A>C v Sloveniji. Nadalje ugotavljajo, da so ti vplivi lahko rezultat drugih polimorfizmov, povezanih s 94C>A. Našli so statistično pomemben vpliv na slabše skupno preživetje in na preživetje brez dogodka pri genotipu 94 CA/AA v primerjavi z divjim tipom ITPA. Tudi mi smo preverili ali genotip ITPA vpliva na preživetje in dobili njim nasprotno rezultate, ki jih lahko razlagamo z ugotovitvami Menezes in sod. (119). Odkrili so, da ima polno aktiven encim ITPA kritično vlogo pri vzdrževanju stabilnosti genoma s preprečevanjem razgradnje DNA. V primeru manj aktivne oblike encima se stopnja razgradnje poveča, celice pa zato uničijo, kar se ujema z rezultati relapsa naše analize. Ugotovili so, da so človeške celice bolj

občutljive za prekinitve, mutagenezo in apoptozo DNA, če se v DNA vgradijo njeni bazni analogi (npr. metaboliti 6-MP) in je gen za ITPA utišán oziroma encim manj aktiven. Nadalje pa tak gen povzroči tudi apoptozo rakavih celic. Te ugotovitve bi tako lahko veljale tudi pri naši skupini bolnikov, saj so imeli bolniki z vsaj enim mutiranim alelom ITPA, poleg zmanjšane verjetnosti za relaps, tudi statistično pomembno večjo verjetnost ( $p=0,030$ ) petletnega preživetja z 71,6 % v primerjavi z divjim tipom, ki ima 56,5 % verjetnost za petletno preživetje brez relapsa (slika 16). Starost in spol v povezavi z encimom ITPA pri relapsu in preživetju nista imela statistično pomembnih vplivov. Protokoli zdravljenja, glede na genotip ITPA, na preživetje niso vplivali, za relaps pa jih nismo mogli izračunati, saj je bila skupina bolnikov za statistično obdelavo v programu SPSS premajhna.



**Slika 16: Petletno preživetje brez relapsa.**

### **4.2.1.3 Hepatotoksičnost**

Na povečano tveganje za hepatotoksičnost, pri polimorfizmih ITPA (94C>A in/ali IVS2+21A>C), statistično pomembnih vplivov nismo našli. Tudi analiza posameznih polimorfizmov IVS2+21A>C in 94C>A ni pokazala statistično pomembnih razlik med skupinami z različnimi genotipi. V skupini bolnikov s hepatotoksičnostjo primerov polimorfizma IVS2+21A>C nismo našli, kar vpliva na rezultat ( $p=0,072 > 0,05$ ). Izmed enajstih bolnikov, ki so doživeli hepatotoksičnost, sta bila dva bolnika heterozigotna in en homozigot za 94C>A. Slednji polimorfizem povezujejo s povečano pojavnostjo hepatotoksičnosti, poleg tega še s pankreatitisom, gripi podobnimi simptomi, srbečico ter febrilno nevtropenijo (98). Ti učinki so največkrat omenjeni predvsem pri pacientih s Crohnovo boleznijo in/ali ulcerativnim kolitisom, manj pri ALL, kar bi lahko vplivalo na rezultat zaradi same patofiziologije in poteka bolezni. Jetra in žolčni sistem sta tesno povezana s črevesjem, trebušna slinavka pa z žolčevodom (120), zato imajo bolniki s kronično vnetno črevesno boleznijo večjo verjetnost za razvoj ekstraintestinalnih zapletov, kot so holangitis in avtoimuni hepatitis (121). Vpliv polimorfizma 94C>A na pojavljanje hepatotoksičnosti in levkopenije je, pri nekaterih raziskavah (88, 116), odvisen tudi od aktivnosti encima ITPA, ki jo v naši raziskavi nismo merili. Potrebno je omeniti še potencialne vplive starosti preiskovancev, kajti jetrna funkcija odraslih ni enaka pediatrični populaciji (122). Hkrati je pomembno razlikovati še med rezultati študij različnih populacij, saj se frekvenca polimorfizma 94C>A in s tem njen vpliv med njimi razlikuje.

### **4.2.2 GNMT 1289 C>T**

Za glicin-N-metil transferazo, enega najpomembnejših encimov vzdrževanja ravnovesja SAM:SAH, smo pričakovali, da bi njegova zmanjšana aktivnost lahko pomembno vplivala na aktivnost encima TPMT, posredno preko SAM-a. SAM je kot donor metilne skupine tesno povezan s TPMT, ki ga uporablja za metabolizem 6-MP v smeri farmakološko neaktivnih produktov. Zaščitno funkcijo izkazuje tudi s post-translacijskim vplivom na protein TPMT (46), z večjim vplivom na tiste strukture, pri katerih zamenjana nukleinska kislina (SNP-ji) povzroči spremembo 3-D strukture proteina (123). SAM z vezavo na TPMT vpliva na zvitje in tako prepreči njegovo razgradnjo (65).



Milek in sod. (46) so ugotovili, da je koncentracija metabolitov 6-MP nižja v prisotnosti eksogenega SAM-a, ter da SAM vzdržuje aktivnost TPMT proteina, kot pozitivni modulator s stabilizacijo TPMT. Manjša aktivnost GNMT bi tako teoretično zmanjšala pretvorbo SAM-a v SAH, višja koncentracija SAM-a pa uspešneje stabilizirala TPMT in upočasnila njegovo razgradnjo. Bolniki z ALL bi s prisotnim polimorfizmom GNMT 1289C>T, kljub polimorfizmu na genu za TPMT, prenašali višje odmerke 6-MP v primerjavi z bolniki z divjim tipom GNMT. Ta hipoteza bi lahko razložila tudi odsotnost neželenih učinkov pri nekaterih bolnikih, s polimorfizmom v genu za TPMT (TPMT\*3A in TPMT\*3C). Podobno povezavo so raziskovali že Karas Kuželički in sod. (124) ter Arenas in sod. (59), vendar s polimorfizmom encima MTHFR. Ugotovili so, da bi mutacija v genu za MTHFR lahko zavirala nastajanje 5,10-metilenTHF in 5-metilTHF, kar bi posledično vodilo do znižanih koncentracij SAM-a in znižane stabilnosti encima TPMT.

Da bi preverili ali polimorfizem v genu za GNMT vpliva na zmanjšanje pojavnosti toksičnih učinkov, ki se pojavijo v povezavi s TPMT genotipom, smo statistično ovrednotili kombinacije divjega tipa GNMT in GNMT 1289C>T s TPMT\*1 in TPMT\*3. Na podlagi ugotovitev drugih raziskovalnih skupin, da polimorfizem na genu za MTHFR vpliva na zmanjšanje razpoložljivosti SAM-a v celici, smo isto kombinacijo analizirali še z izključitvijo vseh bolnikov, s kombinacijo genotipov polimorfizmov MTHFR (677C>T in 1298A>C), ki zmanjšajo aktivnost encima za več kot 55% (114) (677C>T/1298A>C: CC/AA+CC/AC+CT/AA+CC/CC). Kombinacije in rezultate prikazuje preglednici XIV in XV.

**Preglednica XIV: Oznache kombinacij polimorfizmov.**

Genotip	oznaka
GNMT 1289CC	dt
GNMT (1289CT+TT)	mut
GNMT (1289CC) - MTHFR <sup>1</sup> (CC/AA+CC/AC+CT/AA+CC/CC)	A
GNMT (1289CT+TT) - MTHFR <sup>1</sup> (CC/AA+CC/AC+CT/AA+CC/CC)	B

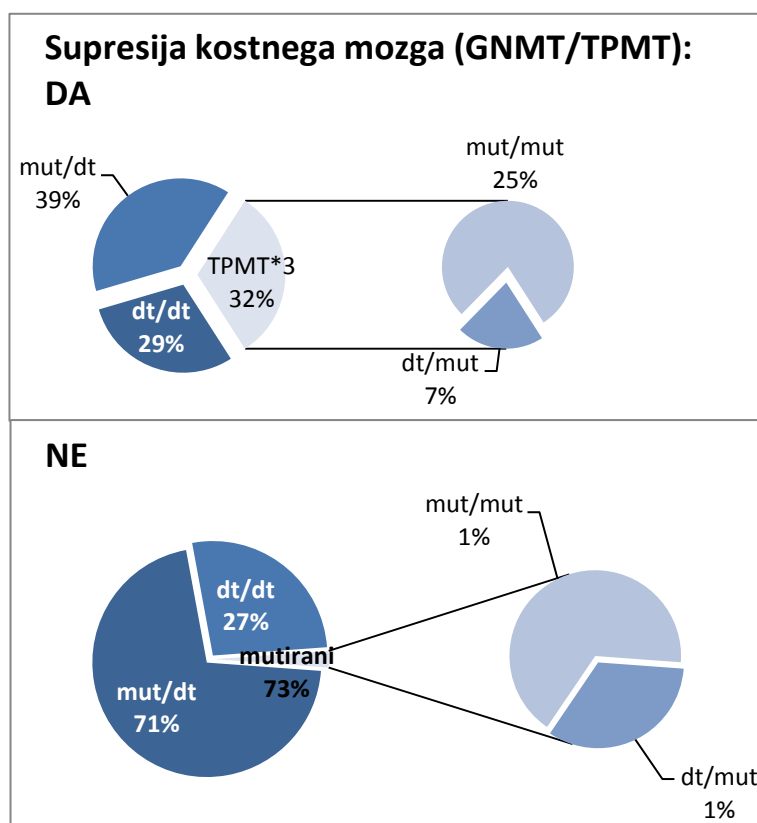
<sup>1</sup>Polimorfizma MTHFR 677C>T in 1298A>C

**Preglednica XV: Povezava med pojavljanjem toksičnih učinkov 6-MP in prisotnost polimorfizmov TPMT ter TPMT v kombinaciji z GNMT.**

TOKSIČNI UČINEK/ POLIMORFIZEM	SKM	stomatitis	sepsa/inf	febrilna nevtropenija	hepato- toksičnost
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
GNMT + TPMT					
dt + TPMT*1 (N=82)	13(15,9)	3 (3,7)	17 (20,7)	3 (3,7)	4 (4,9)
mut + TPMT*1 (N=200)	17 (8,5)	11 (5,5)	37 (18,5)	11 (5,5)	6 (3,0)
p	<b>0,034</b>	0,570 <sup>a</sup>	0,649	0,442	0,361
dt + TPMT*3 (N=5)	3(60,1)	1 (20,0)	2 (40,0)	0	0
mut + TPMT*3 (N=15)	11(73,3)	4 (26,7)	9 (60,0)	1 (6,7)	1 (6,7)
p <sup>b</sup>	0,613	1,000	0,617	1,0000	1,000
GNMT <sup>1</sup> + TPMT					
A + TPMT*1 (N=55)	9 (16,4)	1 (1,8)	10 (18,2)	2 (3,6)	2 (3,6)
B + TPMT*1 (N=135)	10 (7,4)	5 (3,7)	24 (17,8)	7 (5,2)	5 (3,7)
p <sup>b</sup>	0,106	0,674	1,000	1,000	1,000
A + TPMT*3 (N=4)	3 (75,0)	1 (25,0)	2 (50,0)	0	0
B + TPMT*3 (N=8)	6 (75,0)	2 (25,0)	5 (62,5)	1 (12,5)	0
p <sup>b</sup>	1,000	1,000	1,000	1,000	/
TOKSIČNI UČINEK/ POLIMORFIZEM	aseptična nekroza kolkov	sekundarni tumor	relaps	znižanje odmerka za > 10%	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
GNMT + TPMT					
dt + TPMT*1 (N=82)	0	1(1,2)	27/77 (35,1)	19 (23,2)	
mut + TPMT*1 (N=200)	6 (3,0)	4 (2,0)	66/187 (35,3)	33 (16,5)	
p	1,000 <sup>b</sup>	1,000 <sup>b</sup>	0,725 <sup>a</sup>	0,251	
dt + TPMT*3 (N=5)	0	0	1/5 (20,0)	3 (60,0)	
mut + TPMT*3 (N=15)	2 (13,3)	0	6/14 (42,9)	7 (46,7)	
p <sup>b</sup>	1,000	/	0,493 <sup>a</sup>	1,000	
GNMT <sup>1</sup> + TPMT					
A + TPMT*1 (N=57)	0	1 (1,8)	18/51 (35,3)	14 (25,5)	
B + TPMT*1 (N=136)	2 (1,5)	3 (2,2)	51/128 (39,8)	23 (17,0)	
p <sup>b</sup>	1,000	1,000	0,817 <sup>a</sup>	0,225	
A + TPMT*3 (N=5)	0	0	0/4	3 (75,0)	
B + TPMT*3 (N=8)	1 (12,5)	0	3/7 (42,9)	4 (50,0)	
p <sup>b</sup>	1,000	/	0,236	0,576	

n: število bolnikov, pri katerih se je pojavil določen toksičen učinek; N: število vseh bolnikov z določeno kombinacijo alelov; <sup>a</sup> protokoli niso upoštevani zaradi premajhne skupine bolnikov; <sup>b</sup> Fisher eksaktni 2-stranski test, / statistike ni bilo moč izračunati, <sup>1</sup>: skupina bolnikov z izključenimi polimorfizmi MTHFR.

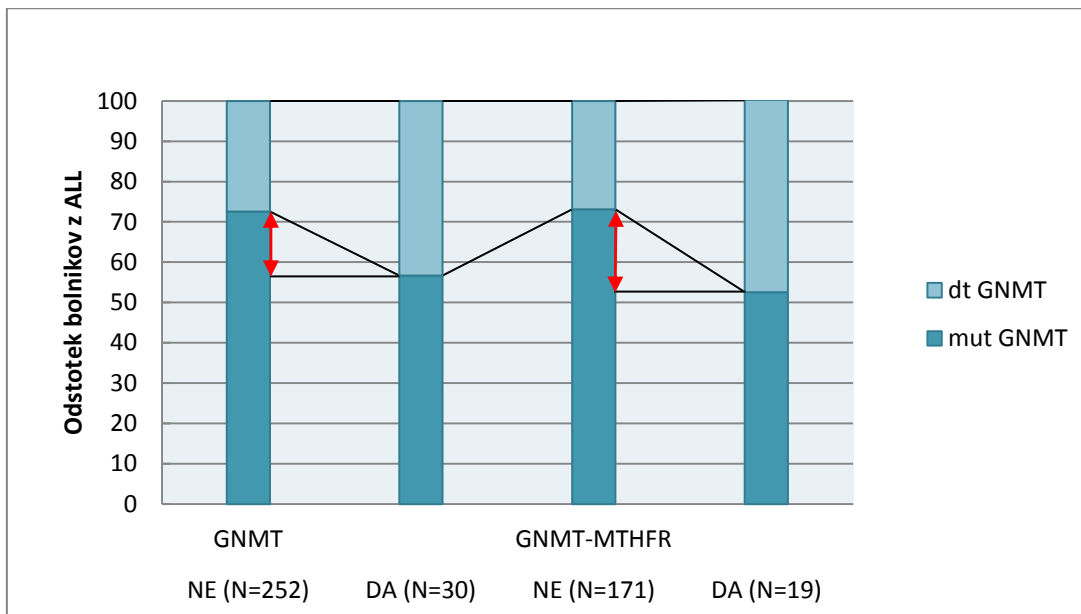
Statistično pomemben vpliv smo našli le pri **SKM**, kjer je prisotnost vsaj enega mutiranega alela polimorfizma GNMT 1289C>T brez izključitve bolnikov z zgoraj omenjenimi polimorfizmi gena MTHFR, vplivala na zmanjšano pojavnost SKM pri bolnikih s TPMT\*1 ( $p=0,034$ ) (slika 17). Tudi pri sepsi/infekciji se je delež bolnikov s TPMT\*1 in prisotnim vsaj enim polimorfizmom GNMT 1289C>T, z in brez izključitve polimorfizmov MTHFR, zmanjšal. Pri bolnikih s TPMT\*3 pa se je ta delež celo povečal. Tudi pri stomatitisu, febrilni nevtropeniji in aseptični nekrozi kolkov se je delež bolnikov, s prisotnim vsaj enim mutiranim alelom GNMT 1289C>T, prav tako povečal, vendar povsod brez statistično pomembne vrednosti. Pri vseh bolnikih z vsaj enim mutiranim alelom GNMT 1289C>T smo opazili manjše število bolnikov z znižanim odmerkom za več kot 10% ( $p>0,05$ ).



**Slika 17: Bolniki z in brez supresije kostnega mozga glede na kombinacijo genotipov GNMT in TPMT (GNMT/TPMT)**

Povezave med polimorfizmom za GNMT in TPMT\*3 nismo našli. Razlog bi bil lahko dejanska povišana koncentracija SAM-a, ki bi s posledično aktivacijo CBS (slika 7, str. 14) povečala pretvorbo homocisteina v smeri cistationa in njegovo nadaljnjo pretvorbo. Hkrati bi prišlo še do inhibicije MTHFR in MAT ter tako do samouravnave SAM-a in s tem premajhne razpoložljivosti za stabilizacijo TPMT\*3. Milek in sod. (123) opisujejo, da povečano aktivnost TPMT preko folatne poti lahko zaznamo le v primeru, ko je na voljo dovolj intraceličnega homocisteina, ki se mora pretvoriti v metionin in naprej v SAM. Razpoložljivost homocisteina je v veliki meri odvisna tudi od prehrane. Normalno se ga kar 53% pretvori v cistation, ko pa se vrednost metilnih skupin v hrani zmanjša je ta pretvorba le še 20% (125). V tem primeru se homocistein porabi za tvorbo metionina ter posledično SAM-a. Pri zdravljenju ALL so bolniki skozi celotno zdravljenje prejeli še metotreksat, ki povzroči pomanjkanje folne kisline, vir metilnih skupin v prehrani. Pri restrikciji folata v prehrani so Beagle in sod. (66) ugotovili, da se pri homozigotih za GNMT 1289 C>T, vrednost prisotnega homocisteina v plazmi statistično pomembno zviša, koncentracija folata v serumu pa se med divjim in polimorfnim tipom GNMT pomembno ne razlikuje. Povišana vrednost homocisteina in nespremenjene vrednosti folata zato postavljajo vprašanje o vrednostih SAM-a, ki ga v študiji niso merili. Nadalje se je vpliv polimorfizma GNMT 1289C>T na povišano koncentracijo bazalnega plazemskega homocisteina statistično pomembno povečal v primeru prisotnega divjega tipa MTHFR 677CC, z **najvišjo vrednostjo plazemskega homocisteina** pri genotipu TT/CC. Prav nasprotno bi pri zmanjšani aktivnosti encima GNMT pričakovali normalno, do zmanjšano vrednost in pri utišanem genu za GNMT **zmanjšano vrednost homocisteina**, kot so jo dobili Luka s sod. (126). Tu bi nato lahko pričakovali povišano vrednost SAM-a. Po drugi strani primerjava z Beagle in sod. zaradi dodatka folne kisline pri terapiji metotreksata ne bi bila ustrezna. Za potrditev povišanja vrednosti SAM-a bi bile zato potrebne njegove meritve. Kot smo tudi že omenili, naj bi prisotnost polimorfizma MTHFR, z zmanjšano razpoložljivostjo 5-metilTHF, zmanjšala nastajanje SAM-a. Vrednosti SAM-a tako ne bi bile dovolj visoke za dodatno stabilizacijo TPMT. Pri naših bolnikih polimorfizmi v genu za MTHFR niso statistično pomembno vplivali na rezultate polimorfizmov GNMT, vendar nismo izključili vseh bolnikov, s prisotnim polimorfizmom MTHFR. Slednje bi povzročilo premajhno skupino bolnikov za analizo. Kljub temu lahko opazimo, da se rezultati med skupinama bolnikov s SKM, z in brez izključitve določenih genotipov polimorfizmov MTHFR, pomembno ne razlikujeta. Iz slike 18 lahko vidimo, da je v skupini iz katere smo

izključili osebe s prisotnimi polimorfizmi v genu za MTHFR, v primerjavi s celotno skupino, večji odstotek bolnikov s SKM pri dt GNMT in manj pri mutiranem GNMT.



**Slika 18: Supresija kostnega mozga pri bolnikih s TPMT\*1 glede na genotip GNMT 1289C>T.**

GNMT: polimorfizem 1289 C>T brez izključitve polimorfizmov MTHFR, GNMT - MTHFR: polimorfizem 1289 C>T z izključitvijo polimorfizmov MTHFR. Z rdečo puščico so nakazane razlike med pojavljanjem SKM med bolniki z dt in mut GNMT.

Milek in sod. (123) so tudi opazili, da se aktivnost encima TPMT med heterozigotnimi osebkami s TPMT\*3, v odvisnosti od vrednosti SAM-a, pomembno ne razlikuje. Tudi mi smo statistično pomemben vpliv polimorfizma GNMT 1289 C>T opazili le pri bolnikih z genotipom TPMT\*1. Pri tem se zopet pojavi nejasnost, saj ravno pri genotipu TPMT\*1 nastane več 6-meTIMP, inhibitorjev DNPS, ki lahko povzročijo pomanjkanje ATP-ja, gradnika za sintezo SAM-a. Po drugi strani pa je TPMT\*1 tudi največji porabnik SAM-a, zato se mogoče vpliv pokaže le pri tem genotipu. Kako je polimorfizem v genu za GNMT vplival na TPMT\*1, pri supresiji kostnega mozga, je za enkrat še nejasno. Lahko bi razloge iskali v mogoči spremenjeni aktivnosti TPMT\*1, zaradi še ne poznanih nefarmakogenetskih faktorjev, vpliva polimorfizma GNMT preko drugih bioloških molekul ali pa je do statistično pomembnega rezultata prišlo zaradi drugih vzrokov, nepovezanih z GNMT in je prisotnost polimorfizma GNMT 1289 C>T le naključje.

## 5 SKLEP

Iz rezultatov naše skupine bolnikov z ALL lahko potrdimo prvo delovno hipotezo, da prisotnost polimorfizma v genu za ITPA, ki zmanjša aktivnost encima, vpliva na pojav toksičnih učinkov pri terapiji s 6-MP. Prisotnost polimorfizma v genu za ITPA je statistično pomembno vplivala na povečano pojavnost febrilne nevtropenije, in sicer v prisotnosti vsaj enega mutiranega alela ITPA ( IVS2+21A>C). Vpliv tega polimorfizma se še poveča pri bolnikih z divjim tipom TPMT (TPMT\*1), zato bi bila potrebna previdnost pri zviševanju odmerka, ko je ta prilagojen na genotip TPMT. Vplivov na supresijo kostnega mozga, sepsa/infekcijo, stomatitis, aseptično nekrozo kolkov, hepatotoksičnost, sekundarni tumor in zmanjšanje odmerka za več kot 10% nismo našli. Na povečano pojavnost relapsa je statistično pomembno vplival divji tip gena ITPA. Ta tip se je v naši skupini bolnikov izkazal tudi za faktor, ki skrajša celokupno preživetje bolnikov. Povezav z odmerkom, pri bolnikih z relapsom, nismo našli. Naši rezultati zato potrjujejo hipoteze in ugotovitve drugih študij, da genotip ITPA vpliva na od odmerka neodvisne neželene učinke in izide zdravljenja. Naše ugotovitve torej kažejo, da polimorfizem v genu za ITPA ne vpliva le na neželene učinke, temveč pozitivno tudi na želene učinke zdravljenja. V naši skupini bolnikov je tudi divji tip gena imel neželene vplive na izid zdravljenja. Ugotovitve o vplivih ITPA so med študijami še vedno zelo različne. V nasprotju s TPMT, je zato klinični pomen ITPA v terapiji ALL še nerazjasnjen. Drugo delovno hipotezo lahko potrdimo le delno. Naši rezultati sicer kažejo, da prisotnost polimorfizma v genu za GNMT 1289C>T posredno vpliva na zmanjšano pojavnost supresije kostnega mozga, vendar le pri bolnikih s TPMT\*1.

## LITERATURA

1. Zver S, Modic M, Žontar D. Opredelitev akutnih limfoblastnih levkemij s celičnimi imunološkimi označevalci. *Zdravstveni Vestnik* 2002; 71: 303-6.
2. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environmental Health Perspectives* 2007; 115 (1): 138-45.
3. Glaser M. Kronične levkemije. *Medicinski razgledi* 2005; 44: 33–41.
4. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®). <http://www.uchospitals.edu/online-library/content=CDR258001>. Dostopano: 13. 09. 2012
5. Esparza SD, Sakamoto KM. Topics in Pediatric Leukemia – Acute Lymphoblastic Leukemia. *Medscape General Medicine* 2005; 7 (1): 23.
6. Dufourg MN, Landman - Parker J, Auclerc MF, et al. Age and high-dose methotrexate are associated to clinical acute encephalopathy in FRALLE 93 trial for acute lymphoblastic leukemia in children *Leukemia* 2007; 21 (2): 238–47.
7. Biondi A, Cimino G, Pieters R, et al. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 2000; 96 (1): 24-33.
8. Pui C-H, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia – current status and future perspectives. *The Lancet Oncology* 2001; 10 (2): 597–607.
9. Lilleyman JS. Acute Lymphoblastic Leukaemia. *European Journal of Cancer* 1997; 33 (1): 85-90.
10. Eden T. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treatment Reviews* 2010; 36 (4): 286–97.
11. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008; 371: 1030–43.
12. Jazbec J, Rajić V, Karas-Kuželički N. Levkemije otroške dobe. 2008; (77): I-25–30.
13. ARSO. Incidenca levkemije pri otrocih. [http://kazalci.ars.gov.si/?data=indicator&ind\\_id=440](http://kazalci.ars.gov.si/?data=indicator&ind_id=440). Dostopano: 11. 10. 2012-
14. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002; 1 (2): 133-43.

15. Sewak MS, Reddy NP, Duan Z-H. Gene Expression Based Leukemia Sub-Classification Using Committee Neural Networks. *Bioinformatics and Biology Insight* 2009; 3: 89–98.
16. Narayanan S, Shami PJ. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2012; 81 (1): 94–102.
17. Will A. Update on leukaemia. *Paediatrics and Child Health* 2008; 18 (3): 107-11.
18. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; 446: 758-64
19. Raimondi SC. Current Status of Cytogenetic Research in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 1993; 81 (9): 2237-51.
20. Hunger SP, Conter V, Raetz EA, et al. Classification and Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Reaman GH, Smith FO, eds. *Childhood Leukemia*: Springer, 2011:79-120.
21. Pui C-H. Recent Research Advances in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of the Formosan Medical Association* 2010; 109 (11): 777–87.
22. Schrappe M. Prognostic Factors in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Indian Journal of Pediatrics* 2003; 70 (10): 817-24.
23. Kumar P, Clark ML. *Kumar and Clark's Clinical Medicine*, 7th Edition. Elsevier, 2009.
24. WHO. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children: A Brief Review of the Internationally Available Protocols. Second Meeting of the Subcommittee of the Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines Geneva, 2008.
25. Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet* 2007; 370: 240-50.
26. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, et al. *Drugs used in cancer chemotherapy*. In: Dimock K, McGrath, S., Cook, L., ed. *Rang and Dale's Pharmacology*. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier, 2007.
27. Seibel NL. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Adolescents: Peaks and Pitfalls. *Hematology* 2008: 374-80.



28. Roberts WM, Estrov Z, Ouspenskaia MV, et al. Measurement of Residual Leukemia during Remission in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 1997; 336: 317-23.
29. Oncology NCPGi. Acute Lymphoblastic Leukemia Version l2012: NCCN, 2012.
30. Harned TM, Gaynon PS. Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia: Current Status and Future Opportunities. *Current Oncology Reports* 2008; 10 (6): 453-8.
31. Möricke A. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 2008; 111 (9): 4477-89
32. Avcin S, Prelog T, Kavcic M, et al. History of treatment and long-term outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia in Slovenia. *Magazine of European Medical Oncology* 2011; 4 (3): 178-83.
33. Herting G, Barber K, Zappala MR, et al. Quantitative in vitro and in vivo characterization of the human P32T mutant ITPase. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1802 (2): 269–74.
34. Sahasranaman S, Howard D, Ro S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Europe Journal of Clinical Pharmacology* 2008; 64 (8): 753 –67.
35. Heller T, Oellerich M, Armstrong VW, et al. Rapid Detection of ITPA 94C>A and IVS2 + 21A>C Gene Mutations by Real-Time Fluorescence PCR and in Vitro Demonstration of Effect of ITPA IVS2 +21A>C Polymorphism on Splicing Efficiency. *Clinical Chemistry* 2004; 50 (11): 2182-4.
36. Fotoohi AK, Coulthard SA, Albertioni F. Thiopurines: Factors influencing toxicity and response. *Biochemical Pharmacology* 2010; 79 (9): 1211–20.
37. de Beaumais TA, Fakhoury M, Medard Y, et al. Determinants of mercaptopurine toxicity in paediatric acute lymphoblastic leukemia maintenance therapy. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2011; 71 (4): 575–84.
38. Kudo M, Aito Y, Sasaki T. SNP Communication; Genetic Variations in the HGPRT, ITPA, IMPDH1 , IMPDH2, and GMPS Genes in Japanese Individuals *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2009; 24 (6): 557–64.
39. Petit E, Langouet S, Akhdar H, et al. Differential toxic effects of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 2008; 22 (3): 632-42.

40. Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, et al. The benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2012; 35 (1): 15-36.
41. BPZ. PURI-NETHOL 50 mg tablete. <http://www.zdravila.net/>. Dostopano:
42. Schmiegelow K, Bretton-Meyer U. 6-Mercaptopurine dosage and pharmacokinetics influence the degree of bone marrow toxicity following high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001; 15 (1): 74–9.
43. Aricó M, Baruchel A, Bertrand Y, et al. The Seventh International Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Workshop Report: Palermo, Italy, January 29–30, 2005. *Leukemia* 2005; 19: 1145–52.
44. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang H, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118 (4): 705-13
45. Armstrong L, Sharif J-A, Galloway P, et al. Evaluating the use of metabolite measurement in children receiving treatment with a thiopurine. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2011; 34 (9): 1106-14.
46. Milek M, Karas-Kuzelicki N, Smid A, et al. S-adenosylmethionine regulates thiopurine methyltransferase activity and decreases 6-mercaptopurine cytotoxicity in MOLT lymphoblasts. *Biochemical Pharmacology* 2009; 77: 1845–53.
47. Karran P. Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. *British Medical Bulletin* 2006; 79-80: 153-70.
48. Zeng X, Yan T, Schupp JE, et al. DNA mismatch repair initiates 6-thioguanine--induced autophagy through p53 activation in human tumor cells *Clinical Cancer Research* 2007; 13 (4): 1315-21.
49. Lennard L, Welch JC, Lilleyman JS. Thiopurine drugs in the treatment of childhood leukaemia: the influence of inherited thiopurine methyltransferase activity on drug metabolism and cytotoxicity. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1997; 44 (5): 455–61.
50. Cheok MH, Lugthart S, Evans WE. Pharmacogenomics of acute leukemia. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2006; 46: 317-53.
51. Hongeng S. Acute and Long-Term Toxicities in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Pharmacogenomics View. 32nd World Congress of the International Society of Hematology (ISH 2008). Bangkok, Thailand, 2008:92-5.

52. Rutherford K, Daggett V. Polymorphisms and disease: hotspots of inactivation in methyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences* 2010; 35 (10): 531 – 8.
53. Dong XW, Zheng Q, Zhu MM, et al. Thiopurine S-methyltransferase polymorphisms and thiopurine toxicity in treatment of inflammatory bowel disease *World Journal of Gastroenterology* 2010; 16 (25): 3187–95.
54. Ansari M, Sauty G, Labuda M, et al. Polymorphisms in multidrug resistance-associated protein gene 4 is associated with outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009; 114 (7): 1383-6.
55. Peng X-X, Shi Z, Damaraju VL, et al. Up-regulation of MRP4 and down-regulation of influx transporters in human leukemic cells with acquired resistance to 6-mercaptopurine. *Leukemia Research* 2008; 32 (5): 799-809.
56. Ford LT, Berg JD. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come. *Journal of Clinical Pathology* 2010; 63 (4): 288-95.
57. Ding L, Zhang F-B, Liu H, et al. Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase activity is related to 6-thioguanine nucleotide concentrations and thiopurine-induced leukopenia in the treatment of inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2012; 18 (1): 63-73.
58. Yang L, Hu X, Xu L. Impact of methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on methotrexate-induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Tumor Biology* 2012; 33 (5): 1445-54.
59. Arenas M, Simpson G, Lewis C, et al. Genetic variation in the MTHFR gene influences thiopurine methyltransferase activity. *Clinical Chemistry* 2005; 51 (12): 2371-4.
60. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, et al. Mercaptopurine Therapy Intolerance and Heterozygosity at the Thiopurine S-Methyltransferase Gene Locus. *Journal of the National Cancer Institute* 1999; 91 (23): 2001-8.
61. Linköping-University. Table of existing TPMT alleles. <http://www.imh.liu.se/tpmtalleles/tabell-over-tpmt-alleler?l=en>. Dostopano: 28. 9. 2012-
62. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype

- and Thiopurine Dosing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2011; 89 (3): 387–91.
63. Dorababu P, Nagesh N, Linga VG, et al. Epistatic interactions between thiopurine methyltransferase (TPMT) and inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) variations determine 6-mercaptopurine toxicity in Indian children with acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2012 68 (4): 379-87.
  64. Ansari A, Arenas M, Greenfield SM, et al. Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2008; 28 (8): 973–83.
  65. Scheuermann TH, Keeler C, Hodsdon ME. Consequences of Binding an S-Adenosylmethionine Analogue on the Structure and Dynamics of the Thiopurine Methyltransferase Protein Backbone. *Biochemistry* 2004; 43 (38): 12198–209.
  66. Beagle B, Yang TL, Hung J, et al. The Glycine N-Methyltransferase (GNMT) 1289 C→T Variant Influences Plasma Total Homocysteine Concentrations in Young Women after Restricting Folate Intake. *The Journal of Nutrition* 2005; 135 (12): 2780-5.
  67. Luka Z, Cerone R, Phillips 3rd JA, et al. Mutations in human glycine N-methyltransferase give insights into its role in methionine metabolism. *Human Genetics* 2002; 110 (1): 68-74.
  68. Chen Y-MA, Chen L-Y, Wong F-H, et al. Genomic Structure, Expression, and Chromosomal Localization of the Human Glycine N-Methyltransferase Gene. *Genomics* 2000; 66 (1): 43– 7
  69. Grillo MA, Colombatto S. S-adenosylmethionine and its products. *Amino Acids* 2008 34 (2): 187–93.
  70. Shelly CL. S-Adenosylmethionine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2000; 32 (4): 391-5.
  71. Mlinaric-Rascan I, Milek M, Smid A, et al. S-Adenosylmethionine: A Novel Factor in the Individualization of Thiopurine Therapy. In: Sanoudou D, ed. *Clinical Applications of Pharmacogenetics Intech*, 2012:95-118.
  72. Martinov MV, Vitvitsky VM, Banerjee R, et al. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1804 (1): 89–96.

73. Barić I, Fumić K, Glenn B, et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: A genetic disorder of methionine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 101 (12): 4234-9.
74. Hogarth LA, Redfern CPF, Teodoridis JM, et al. The effect of thiopurine drugs on DNA methylation in relation to TPMT expression. *Biochemical Pharmacology* 2008; 76 (8): 1024–35.
75. Wijekoon EP, Brosnan ME, Brosnan JT. Homocysteine Metabolism. In: Cheema SK, ed. *Biochemistry of Atherosclerosis*. New York: Springer, 2006:327-57.
76. Mudd SH. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: a review. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 2011; 157 (1): 3–32.
77. Takata Y, Huang Y, Komoto J, et al. Folate status modulates the induction of hepatic glycine N-methyltransferase and homocysteine metabolism in diabetic rats. *Biochemistry* 2003; 42 (28): 8394-402.
78. Huang Y-C, Lee C-M, Chen M, et al. Haplotypes, Loss of Heterozygosity, and Expression Levels of Glycine N-Methyltransferase in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* 2007; 13 (5): 1412-20.
79. Luka Z, Pakhomova S, Luka Y, et al. Destabilization of human glycine N-methyltransferase by H176N mutation. *Protein Science* 2007; 16 (9): 1957–64.
80. Wang Y-C, Tang F-Y, Chen S-Y, et al. Glycine-N Methyltransferase Expression in HepG2 Cells Is Involved in Methyl Group Homeostasis by Regulating Transmethylation Kinetics and DNA Methylation. *Journal of Nutrition* 2011; 141 (5): 777-82.
81. Augoustides-Savvopoulou P, Luka Z, Karyda S, et al. Glycine N-methyltransferase deficiency: A new patient with a novel mutation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2003; 26 (8): 745-59.
82. Tseng T-L, Shih Y-P, Huang Y-C, et al. Genotypic and Phenotypic Characterization of a Putative Tumor Susceptibility Gene, GNMT, in Liver Cancer. *The Journal of Cancer Research* 2003; 63 (3): 647-54.
83. Luka Z, Wagner C. Effect of naturally occurring mutations in human glycine N-methyltransferase on activity and conformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 312 (4): 1067–72.

84. Lin S, McLennan AG, Ying K, et al. Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the itpa gene. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276 (22): 18695-701.
85. Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. *Human Genetics* 2002; 111 (4-5): 360-7.
86. Galperin MY, Moroz OV, Wilson KS, et al. House cleaning, a part of good housekeeping. *Molecular Microbiology* 2006; 59 (1): 5–19.
87. Bierau J, Lindhout M, Bakker JA. Pharmacogenetic significance of inosine Triphosphatase. *Pharmacogenomics* 2007; 8 (9): 1221-8.
88. Shipkova M, Lorenz K, Oellerich M, et al. Measurement of Erythrocyte Inosine Triphosphate Pyrophosphohydrolase (ITPA) Activity by HPLC and Correlation of ITPA Genotype-Phenotype in a Caucasian Population. *Clinical Chemistry* 2006; 52 (2): 240-7.
89. Sakumi K, Abolhassani N, Behmanesh M, et al. ITPA protein, an enzyme that eliminates deaminated purine nucleoside triphosphates in cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2010; 703 (1): 43–50.
90. Maeda T, Sumi S, Ueta A, et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in the Japanese population. *Molecular Genetics and Metabolism* 2005; 85 (4): 271–9.
91. Stenmark P, Kursula P, Flodin S, et al. Crystal Structure of Human Inosine Triphosphatase: Substrate binding and implication of the inosine triphosphatase deficiency mutation P32T. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282 (5): 3182-7.
92. Bakker JA, Lindhout M, Habets DDJ, et al. The Effect of ITPA Polymorphisms on the Enzyme Kinetic Properties of Human Erythrocyte Inosine Triphosphatase Toward its Substrates ITP and 6-Thio-ITP. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 2011; 30 (11).
93. Xiong H, Xin HW, Wu XC, et al. Association between inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency and azathioprine-related adverse drug reactions in the Chinese kidney transplant recipients. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2010; (24): 393–400.

94. Arenas M, Duley J, Sumi S, et al. The ITPA c.94C>A and g.IVS2+21A>C sequence variants contribute to missplicing of the ITPA gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1772 (1): 96-102.
95. Hitomi Y, Cirulli ET, Fellay J, et al. Inosine Triphosphate Protects Against Ribavirin-Induced Adenosine Triphosphate Loss by Adenylosuccinate Synthase Function. *Gastroenterology* 2011; 140 (4): 1314-21.
96. Atanasova S, Shipkova M, Svinarov D, et al. Analysis of ITPA Phenotype-Genotype Correlation in the Bulgarian Population Revealed a Novel Gene Variant in Exon 6. *Therapeutic Drug Monitoring* 2007; 29 (1): 6-10.
97. Marsh S, King C, Ahluwalia R, et al. Distribution of ITPA P32T alleles in multiple world populations. *Journal of Human Genetics* 2004; 49 (10): 579-81.
98. Marinaki AM, Ansari A, Duley JA, et al. Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). *Pharmacogenetics* 2004; 14 (3): 181-7.
99. Stocco G, Cheok MH, Crews KR, et al. Genetic Polymorphism of Inosine Triphosphate Pyrophosphatase Is a Determinant of Mercaptopurine Metabolism and Toxicity During Treatment for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2009; 85 (2): 164-72.
100. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988 16 (3): 1215.
101. TaqMan SNP Genotyping Assays protocol. Applied Biosystems, 2006.
102. Polymerase chain reaction  
<http://www2.le.ac.uk/departments/emfpu/genetics/explained/pcr>. Dostopano: 13. 08. 2012-
103. Žager U. Farmakogenetska analiza polimorfizma 677 C>T v genu za 5,10-metilentetrahidrofolatno reduktazo pri otrocih z akutno limfoblastno levkemijo. Fakulteta za farmacijo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 2007.
104. Dorak MT. Real-time PCR. Taylor & Francis Group, 2006.
105. Koch WH. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3 (9): 749-61.
106. Allelic Discrimination Using the 5' Nuclease Assay. AB Applied Biosystems, 2001.

107. Osgood-McWeeney D, Galluzzi JR, Ordovas JM. Allelic Discrimination for Single Nucleotide Polymorphisms in the Human Scavenger Receptor Class B Type 1 Gene Locus Using Fluorescent Probes. *Clinical Chemistry* 2000; 46 (1): 118-9
108. TaqMan® Allelic Discrimination Demonstration Kit. AB Applied Biosystems, 2000.
109. Li M, Li C. Assessing departure from Hardy-Weinberg equilibrium in the presence of disease association. *Genetic Epidemiology* 2008; 32 (7): 589-99.
110. Cao H, Hegele RA. DNA polymorphisms in ITPA including basis of inosine triphosphatase deficiency. *Journal of Human Genetics* 2002; 47 (11): 620-2.
111. Marinaki AM, Sumi S, Arenas M, et al. Allele Frequency of Inosine Triphosphate Pyrophosphatase Gene Polymorphisms in a Japanese Population. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2004; 23 (8,9): 1399–401.
112. Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, et al. Inosine triphosphatase genetic variants are protective against anemia during antiviral therapy for HCV2/3 but do not decrease dose reductions of RBV or increase SVR. *Hepatology* 2011; 53 (2): 389–95.
113. Bierau J, Bakker JA, Schippers JA, et al. Erythrocyte Inosine Triphosphatase Activity Is Decreased in HIV-Seropositive Individuals. *PLoS One* 2012; 7 (1): e30175.
114. Panovska Z. Povezanost polimorfizmov v izbranih genih folatnega cikla z napakami nevralne cevi Fakulteta za farmacijo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 2010.
115. Karas-Kuzelicki N, Jazbec J, Milek M, et al. Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia* 2009; 23: 971–4.
116. Tanaka Y, Manabe A, Nakadate H, et al. The activity of the inosine triphosphate pyrophosphatase affects toxicity of 6-mercaptopurine during maintenance therapy for acute lymphoblastic leukemia in Japanese children. *Leukemia Research* 2012; 36 (5): 560–4.
117. Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, et al. Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2008; 66 (4): 517–28.



118. Kim H, Kang H, Kim H, et al. Pharmacogenetic Analysis of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Possible Association between Survival Rate and ITPA Polymorphism. *PLoS One* 2012; 7 (9): e45558.
119. Menezes MR, Waisertreiger I-R, Lopez-Bertoni H, et al. Pivotal Role of Inosine Triphosphate Pyrophosphatase in Maintaining Genome Stability and the Prevention of Apoptosis in Human Cells. *PLoS ONE* 2012:e32313.
120. (CCFA) TCsaCFoA. Liver Disease and IBD. <http://www.ccfa.org/resources/liver-disease-and-ibd.html>. Dostopano: 14. 10. 2012-
121. McGowan CE, Jones P, Long MD, et al. Changing shape of disease: Nonalcoholic fatty liver disease in Crohn's disease—A case series and review of the literature. *Inflammatory Bowel Diseases* 2012; 18 (1): 49–54.
122. Ginsberg G, Hattis D, Sonawane B, et al. Evaluation of Child/Adult Pharmacokinetic Differences from a Database Derived from the Therapeutic Drug Literatur. *Toxicological Sciences* 2002; 66 (2): 185-200.
123. Milek M, Smid A, Tamm R, et al. Post-translational stabilization of thiopurine S-methyltransferase by S-adenosyl-L-methionine reveals regulation of TPMT\*1 and \*3C allozymes. *Biochemical Pharmacology* 2012; 83: 969–76.
124. Karas Kuželički N, Milek M, Jazbec J, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) low activity genotypes reduce the risk of relapse-related acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leukemia Research* 2009; 33 (10): 1344–8.
125. Martínez-Chantar ML, García-Trevijano ER, Latasa MU, et al. Importance of a deficiency in S-adenosyl-l-methionine synthesis in the pathogenesis of liver injury. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 76 (5): 11775-825.
126. Luka Z, Mudd SH, Wagner C. Glycine N-Methyltransferase and Regulation of S-Adenosylmethionine Levels. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 22507-11.
127. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 2010; 24 (2): 265-84.

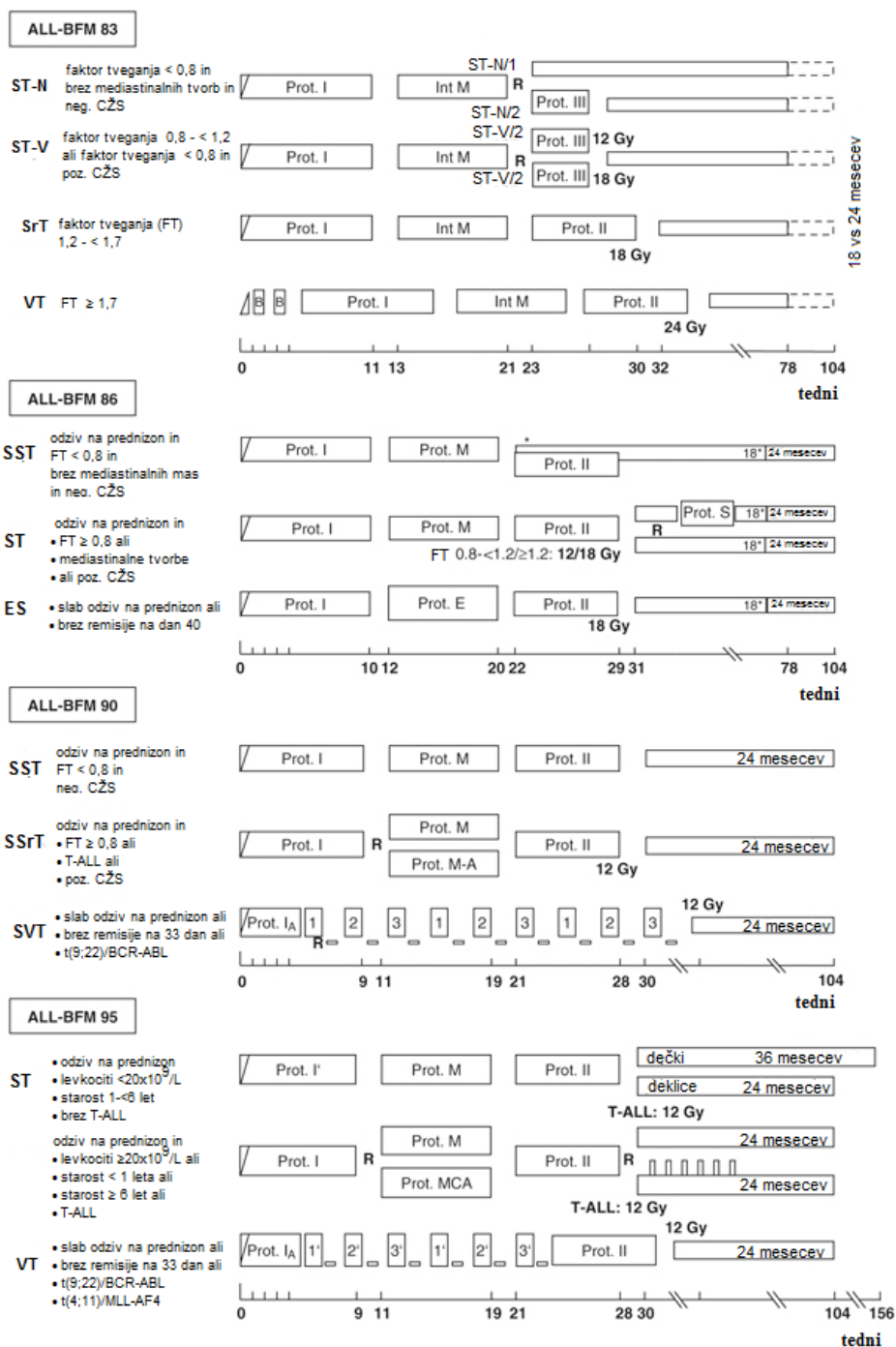
## KAZALO SLIK IN PREGLEDNIC

Slika 1: Shematski prikaz delitve in razvoja krvnih celic. ....	1
Slika 2: Zdravilne učinkovine in njihovo delovanje pri terapiji ALL, ki se uporabljajo v protokolih ALL-BFM. ....	4
Slika 3: Protokol ALL-BFM 95 za skupino s standardnim tveganjem.. ....	6
Slika 4: Kemijska struktura tiopurinov in hipoksantina. ....	7
Slika 5: Metabolizem 6-MP.....	9
Slika 6: Katabolna pot metabolizma 6-MP, z encimom TPMT. ....	10
Slika 7: Shematični prikaz vloge GNMT in sintezne poti SAM-a ter njegova regulacija..	14
Slika 8: Humani gen GNMT.....	15
Slika 9: Mesto gena ITPA na kromosomu 20.....	18
Slika 10: Shematični prikaz klasične PCR reakcije.....	23
Slika 11: Shematični prikaz metode TaqMan®. ....	24
Slika 12: Genotipizacija ITPA IVS2 + 21 A>C.....	25
Slika 13: Bolniki z ali brez febrilne nevtropenije, glede na genotip ITPA v %.....	36
Slika 14: Bolniki z ali brez relapsa, glede na genotip ITPA v %. ....	37
Slika 15: Zvišanje odmerkov pri bolnikih z relapsom, glede na bolnikov genotip ITPA...	38
Slika 16: Petletno preživetje brez relapsa.....	39
Slika 17: Bolniki z in brez supresije kostnega mozga glede na kombinacijo genotipov GNMT in TPMT (GNMT/TPMT) .....	43
Slika 18: Supresija kostnega mozga pri bolnikih s TPMT*1 glede na genotip GNMT 1289C>T.....	45
Preglednica I: WHO 2008 klasifikacija ALL.....	3
Preglednica II: Število in odstotek bolnikov po protokolih.....	21
Preglednica III: Sestava reagentov za genotipizacijo z metodo PCR v realnem času.....	26
Preglednica IV: TaqMan sonde, ki ustrezajo določenim alelom genov ITPA in GNMT...	26
Preglednica V: Tri različne volumske sestave reakcijske mešanice za genotipizacijo. ....	27
Preglednica VI: Program genotipizacije.....	28
Preglednica VII: Rezultati opazovanih in pričakovanih vrednosti frekvenc genotipa ITPA 94C>A .....	30
Preglednica VIII: Rezultati opazovanih in pričakovanih vrednosti frekvenc genotipa ITPA IVS2+21A>C.....	31
Preglednica IX: Primerjava alelnih frekvenc svetovne populacije.....	31
Preglednica X: Rezultati opazovanih in pričakovanih vrednosti frekvenc genotipa GNMT 1289C>T.....	32
Preglednica XI: Povezava med pojavljanjem toksičnih učinkov v vzdrževalni fazi zdravljenja in prisotnost polimorfizmov ITPA in TPMT in njunih kombinacij. ....	34
Preglednica XII: Povezava med pojavljanjem toksičnih učinkov v vzdrževalni fazi zdravljenja in prisotnost polimorfizmov ITPA in TPMT in njunih kombinacij. ....	35
Preglednica XIII: Odmerek pri bolnikih z relapsom .....	38
Preglednica XIV: Označbe kombinacij polimorfizmov. ....	41

Preglednica XV: Povezava med pojavljanjem toksičnih učinkov 6-MP in prisotnost polimorfizmov TPMT ter TPMT v kombinaciji z GNMT.....	42
Priloga 1: Primerjava protokolov ALL-BFM 83/86/90/95 .....	60

# PRILOGA

## Priloga 1: Primerjava protokolov ALL-BFM 83/86/90/95 (Prirejeno po (127)).



ST-(N/V): standardno tveganje, nizko/visoko; SrT: srednje tveganje; VT: visoko tveganje; Prot.I: faza indukcije; Int M: konsolidacijsko-intenzifikacijska faza; Prot. II/III: reintenzifikacijska faza oz. pozna intenzifikacijska faza-ponovitev indukcije; R: randomizacija; Prot.S: pozni re-intenzifikacijski element; SST: skupina s standardnim tveganjem; ST: skupina s tveganjem; ES: eksperimentalna skupina; Prot. E: eksperimentalni protokol z intenzivnim konsolidacijskim zdravljenjem; Prot.M-A: protokolu M dodana L-Asparaginaza; Prot. MCA: protokolu M dodan antraciklin citarabin; SSrT: skupina s srednjim tveganjem; SVT: skupina z visokim tveganjem. Odziv na prednizon je pomemben prognostični faktor.