

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Klin. asist. dr Jelena L. Lazić

ZNAČAJ POLIMORFIZAMA U GENIMA KOJI
KODIRAJU ENZIME UKLJUČENE U
METABOLIZAM METOTREKSATA U DECE SA
AKUTNOM LIMFOBLASTNOM LEUKEMIJOM

Doktorska disertacija

Beograd, april 2016 godine.

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Asist. prof. Jelena L. Lazic, MD

THE SIGNIFICANCE OF POLYMORPHISMS IN THE
GENES ENCODING ENZYMES INVOLVED IN THE
METABOLISM OF METHOTREXATE IN CHILDREN
WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Doctoral dissertation

Belgrade, April 2016.

Mentor:

Doc. dr Nada Krstovski, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Služba za hematologiju i onkologiju, Univerzitetska de ja klinika

lanovi Komisije:

- 1 Prof. dr Dragana Jani , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Služba za hematologiju i onkologiju, Univerzitetska de ja klinika
- 2 Prof. dr Lidija Dokmanovi , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Služba za hematologiju i onkologiju, Univerzitetska de ja klinika
- 3 N. sav. dr Sonja Pavlovi , nau ni savetnik, Laboratorija za molekularnu genetiku biomedicinu, Institut za molekularnu genetiku i geneti ki inžinjeri ng, Univerzitet u Beogradu

ZAHVALJUJEM SE

Prof. dr Dragani Jani , koja mi je širom otvorila vrata pedijatrijske hematologije i onkologije, umešno vodila kroz njene lavirinte i uinila da taj put bude lepši i jednostavniji.

Doc. dr Nadi Krstovski, na podršci i prenesenim znanjima koja svaki cilj uini lakše dostupnim.

Prof. dr Lidiji Dokmanovi na dugogodišnjoj kolegijalnoj i prijateljskoj posve enosti..

Dr sci. Sonji Pavlovi NS, koja me je naučila da je genetika kao muzika, bez ograničenja, uvek inspirativna za pomeranje granica.

Dr sci. Nikoli Koturu i dr sci. Branki Zuki , na predanosti u izradi disertacije i dr sci Nataši Toši koja je odavno prevazišla put od saradnika do prijatelja.

Mr sci. med. Pe i Rodi u, mr sci. med. Sr i Jankovi u i dr Goranu Miloševi u nastru noj i drugarskoj pomoći, prožetoj nezaobilaznim humorom.

Dr Milici ori i dr Jeleni Kova evi , koje požrtvovanošću i entuzijazmom uine svaki problem lakše rešivim.

Prof. dr Jelici Predojevi , dr Biljani Banjac i dr Dragani Mal i , na višegodišnjoj lepoj i lako izvodivoj saradnji, bez obzira na prostornu udaljenost.

VMT Branislavu or evi u i VMT Maji Lazovi na nesvakidašnjem trudu i sjajnoj radnoj atmosferi.

Kolegama iz citogenetske i biohemijske laboratorije Univerzitetske de je klinike, koji su značajno doprineli realizaciji disertacije.

Sestrama Službe za hematologiju i onkologiju Univerzitetske de je klinike na predanom radu sa našim bolesnicima.

Porodici, na bezgraničnoj podršci i neizmernoj radosti, koji su tajni heroji svakog uspeha.

Prijateljima, koje odavno smatram porodicom, koje svaki napor oboje smisljenošću.

Mami, kojoj posve ujem ovaj rad, uz njenu ljubav i podršku ne postoji nesavladiva prepreka, od prvih reči i koraka, do izrade ove teze i ostvarivanja svih budućih izazova.

Rezime

Značaj polimorfizama u genima koji kodiraju enzime uključene u metabolizam metotreksata u dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom

Uvod: Akutna limfoblastna leukemija (ALL) je najčešća maligna bolest u pedijatrijskom uzrastu. Primenom savremenih protokola postignuto je preživljavanje u skoro 90% obolele dece. Najnovija istraživanja su usmerena ka farmakogenetici, sa ciljem da se smanji toksičnost primenjenih lekova, koji mogu biti uzrok smrtnog ishoda ili dugoročnih komplikacija koje utiču na kvalitet života po završetku lečenja. Na osnovu farmakogenetskih ispitivanja se može vršiti modulacija terapije, odnosno odrediti dozni režim lekova koji je prilagođen svakom pacijentu. Metotreksat (engl. *Methotrexate* – MTX) je antagonist folata i jedan je od ključnih lekova u terapijskim protokolima za pedijatrijsku ALL. Delotvoran je u postizanju i održavanju remisije u dece sa ALL, ali su odavno poznata neželjena dejstva koja njegova primena može da izazove.

Ciljevi: Sastoje se u ispitivanju uticaja gena koji kodiraju enzime uključene u metabolizam MTX i njihovih varijanti na tok i ishod lečenja dece obolele od ALL. Na prvom mestu cilj doktorske disertacije je bio da se utvrdi uestalost varijanti c.677C>T i c.1289A>C u genu za *MTHFR*, -680 C>A, -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T i -317 A>G u genu za *DFHR*, c.80G>A u genu za *SLC19A1*, 28 bp tandemski ponovak i 6 bp delecija u genu za *TYMS*. U ustalost polimorfizama je ispitana u dece obolele od ALL i kontrolnoj grupi i uinjena je uporedna analiza incidence u bolesnih i zdravih osoba. Nezavisno od farmakogenetičkih markera, cilj je bio da se ispita farmakokinetika (engl. *Pharmacokinetics* – PK) MTX i da se dobijeni rezultati koreliraju sa navedenim polimorfizmima. Takođe, praćena je klinička i laboratorijska toksičnost terapije MTX i istraženo je da li postoji povezanost pojedinačnih ili udruženih varijanti u ispitanim genima sa povećanom toksičnošću u MTX. Na osnovu ispitanih parametara ideja je bila da se utvrdi da li postoji modulacija terapije i u kojoj meri kod prisustva pojedinačnih i/ili udruženih genetičkih varijanti. Krajnji cilj je bio da se utvrdi uticaj navedenih polimorfizama u genima za *DFHR*, *MTHFR*, *SLC19A1* i *TYMS* na ishod dece obolele od ALL.

Materijal i metode: Dijagnostika i le enje 161 deteta obolelog od ALL sprovedeno je u Službi za hematologiju i onkologiju Univerzitetske de je klinike (UDK) po kriterijumima i smernicama savremenih internacionalnih protokola. U istoj ustanovi su pra ena PK MTX, kao i klini ka i laboratorijska toksi nost, dok su farmakogeneti ke analize ra ene na Institutu za medicinsku genetiku i geneti ki inžinjeri ng u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu. Za uzorkovanje biološkog materijala su roditelji pacijenata dali pismenu saglasnost. Kontrolna grupa je obuhvatila 104 zdrava ispitanika.

DNK je izolovana pomo u *QIAamp DNA Blood Mini Kita* prema uputstvu proizvo a a. Analiza DNK vršena je elektroforetskim razdvajanjem na horizontalnom agaroznom gelu, dok je za analizu DNK fragmenata koriš ena elektroforeza na poliakrilamidnom gelu. Varijante u genu *TYMS* su odre ivane PCR metodom. PCR-RFLP metoda je koriš ena za odre ivanje varijante tipa SNV, konkretno *MTHFR* c.677 C>T. Alel-specifi ni PCR je bio metoda izbora za *MTHFR* c.1298 A>C i *SLC19A1* c.80 G>A. Za detekciju varijanti u promotoru gena *DHFR* je ra eno sekvenciranje PCR produkata. Statisti ka obrada podataka je vršena odgovaraju im testovima u zavisnosti od prirode posmatrane varijable.

Rezultati: Istraživanje je ukazalo da ne postoji razlika u u estalosti ispitivanih geneti kih varijanti u genima za *MTHFR*, *DFHR*, *SLC19A1* i *TYMS* izme u dece obolele od ALL i zdravih osoba. Dokazana je niska incidenca nepovoljnih genotipova u našoj populaciji i prikazani su pojedina ni naj eš i haplotipovi ispitivanih gena. Nije vi en uticaj pola na u estalost detektovanih polimorfizama u navedenim genima, ali je pokazano da deca kod kojih je detektovan *TYMS* 6 bp D/D polimorfizam kasnije obolevaju od ALL u odnosu na druge geneti ke varijante u istom genu.

U odnosu na imunofenotipske karakteristike, pokazana je statisti ki zna ajna razlika me u ispitivanim genima: *MTHFR* c.1298 A>C korelira sa manje povoljnim, T- elijskim imunofenotipom, dok se *DHFR* varijante -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T detektuju isklju ivo u dece sa B- elijskom ALL. Nije vi ena povezanost izme u ekstramedularne propagacije, na prvom mestu u centralni nervni sistem (CNS infiltracija) i detektovanih polimorfizama. Pokazana je korelacija geneti kih varijanti u *TYMS* genu sa kompleksnim kariotipom u dece sa ALL.

Prikazana je brzina ulaska u remisiju bolesti u ta no odre enim vremenskim odrednicama i vi ena je korelacija odre enih geneti kih varijanti sa sporijom kinetikom blasta 15. dana le enja, procenjeno morfološkim pregledom koštane srži: *TYMS* 6bp i 28 bp i *DHFR* -680 C>A i -317 A>G. Polimorfizmi u ispitivanim genima nisu uticali na stepen remisije 33. dana terapije.

Pokazano je da su ve u ukupnu (klini ku i laboratorijsku) toksi nost ispoljila deca koja su primala niže doze MTX ($2\text{g}/\text{m}^2$ vs $5\text{g}/\text{m}^2$) i da se broj i stepen neželjenih efekata statisti ki zna ajno eš e javljao u starijem uzrastu, prose no u desetoj godini života. Vi eno je da parenteralna primena MTX u intenzivnoj fazi le enja eš e dovodi do pojave klini ke toksi nosti u odnosu na peroralnu primenu u završnoj fazi terapijskog protokola, kada se u ve em procentu detektuje laboratorijska toksi nost, na prvom mestu hepatotoksi nost. Deca kod kojih su se ispoljila neželjena dejstva terapije MTX su u najve em broju imala nizak stepen toksi nosti, prema jasno definisanom gradiranju u internacionalnim vodi ima. U odnosu na PK, dokazano je da je naj eš e usporenje eliminacije leka vi eno u 48. satu od po etka primene MTX i da je u najve em broju dece trajalo manje od 24h, uz dodatne terapijske mere, predvi ene protokolom le enja. Vi en je protektivni efekat varijante c.677 T/T u *MTHFR* genu u bolesnika koji su primali niže doze MTX: deca sa tim polimorfizmom su najre e ispoljavala toksi nost tokom primene leka u dozi od $2\text{g}/\text{m}^2$. Korelacijom PK i varijanti u ispitivanim genima pokazano je da su deca sa *TYMS* 6bp D/D varijantom statisti ki zna ajno eš e imala povišene nivoe MTX. Tako e, deca sa varijantama *MTHFR* c.1298 C/C, *DHFR* -675 G/G, -556 C/C i -464 T/T i *SLC19A1* c.80 A/A vremenom ispoljavaju ve u toksi nost MTX pri ponavljanim ekpozicijama ve im dozama leka ($5\text{g}/\text{m}^2$).

Ukupno preživljavanje ispitanika u studiji je iznosilo 87%. Jasno su definisani i prikazani razli iti faktori koji uti u na prognozu, me u kojima se izdvojila varijanta -464 T/T u *DHFR* genu. Deca sa tim polimorfizmom su zna ajno eš e razvila recidiv osnovne bolesti što je uticalo na nepovoljan krajnji ishod le enja.

Zaklju ak: Disertacija doprinosi razumevanju mehanizama koji u estvuju u klini kom i laboratorijskom ispoljavanju toksi nosti tokom primene MTX. Ovim istraživanjem rasvetljeni su izvesni aspekti vezani za ulogu ispitivanih geneti kih varijanti u leukemogenezi i njihova povezanost sa ishodom dece obolele od ALL.

Navedeni rezultati potkrepljuju pretpostavku da farmakogenetički markeri utiču na pojavu i stepen toksičnosti tokom terapije MTX. Takođe, ukazuju na značaj prevencije toksičnosti kroz modulaciju doznog režima prema genetskom profilu pacijenta. Korelacija određenih genetičkih varijanti sa recidivom osnovne bolesti svrstava ispitane polimorfizme u individualne prognostičke faktore kod pedijatrijskih pacijenata sa ALL.

Cljučne reči: pedijatrijska akutna limfoblastna leukemija, varijacije u genima *MTHFR*, *DHFR*, *SLAC19A1* i *TYMS*, metotreksat

Naučna oblast: pedijatrija

Uža naučna oblast: hematologija, farmakogenetika

The significance of polymorphisms in the genes encoding enzymes involved in the metabolism of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia

Objective: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignant disease among children and adolescents. Contemporary protocols ensure survival rate in almost 90% of affected children. The latest research is directed towards pharmacogenetics, in order to reduce the toxicity of applied drugs, which may be the cause of death or long-term complications that affect the quality of life after completion of treatment. Pharmacogenetic studies are offering basis for therapy modulation, by changing drugs dosage regimen in order to tailor the therapy according to needs of each affected patient. Methotrexate (MTX) is a folate antagonist and is one of the key drugs in therapeutic protocols for pediatric ALL. MTX is effective in achieving and maintaining remission in children with ALL, but possible adverse side effects of its use are already well known.

Aims: The most important goal was to test the influence of genes encoding enzymes involved in the metabolism of MTX and their variants on the course and outcome of children with ALL. First and foremost objective of the doctoral dissertation was to determine the frequency of variants c.677C>T and c.1289A>C in *MTHFR* gene, -680 C>A, -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T and -317 A>G in *DFHR* gene, c.80G> A in *SLC19A1* gene, 6 bp deletion and 28 bp tandem repeats in *TYMS* gene. The incidence of polymorphisms in children with ALL and a control group was explored and afterwards compared in order to investigate eventual different pattern between pediatric ALL patients and healthy individuals. The goal was to investigate the pharmacokinetics (PK) and clinical and laboratory toxicity during MTX treatment and then to correlate with the aforementioned polymorphisms with the idea to explore whether there is a relationship of single or associated variants in the selected genes with already established MTX toxicity. The aim was to investigate the extent of therapy modulation in presence of individual and/or associated genetic variants by summarizing all results related to MTX toxicity. The ultimate goal was to determine the effect of aforementioned polymorphisms in genes *MTHFR*, *DFHR*, *SLC19A1* and *TYMS* to the outcome of children with ALL.

Materials and Methods: Study enrolled 161 children with ALL in whom diagnosis and treatment was conducted at the Department of Hematology and Oncology at University Children's Hospital (UCH) according to the criteria and guidelines of contemporary international protocols. In the same institution PK of MTX was performed, as well as clinical and laboratory parameters of toxicity, while pharmacogenetics analysis were done at the Institute of Medical Genetics and Genetic Engineering Laboratory for Molecular Biomedicine. Written consent was obtained from parents for the biological material sampling at diagnosis. The control group included 104 healthy subjects.

DNA was isolated using QIAamp DNA Blood Mini Kit according to the manufacturer's instructions. DNA analysis was carried out by electrophoretic separation on a horizontal agarose gel electrophoresis, and the DNA fragments used for polyacrylamide gel electrophoresis. Variants in the *TYMS* gene were determined by PCR method. PCR-RFLP method was used to determine the type SNV variants, namely *MTHFR* c.677 C>T. Allele-specific PCR has been the method of choice for *MTHFR* c.1298 A>C and *SLC19A1* c.80 G>A. Sequencing the PCR products was done for the detection of variants in the promoter of the *DHFR* gene. Statistical analysis was performed by appropriate tests depending on the characteristics of the observed variables.

Results: Results did not indicate the differences in incidence of investigated variants in *MTHFR*, *DFHR*, *SLC19A1* and *TYMS* genes between children with ALL and healthy individuals. Low incidence of adverse genotypes was proven in our population and the most common single gene haplotypes were point out. There was no effect of gender on the incidence of detected polymorphisms in investigated genes, but it was shown that children with *TYMS* 6 bp D/D polymorphism developed ALL in older age in comparison with other variants in the same gene.

Considering the immunophenotypic characteristics, statistically significant difference was demonstrated: *MTHFR* c.1298 A>C correlates with less favorable T-cell immunophenotype, while the *DHFR* variants -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T were detected only in children with B-cell ALL. Association between extramedullary disease, primarily in the central nervous system (CNS infiltration), and detected polymorphisms was not seen. Strong correlation of genetic variants in the *TYMS* gene with complex karyotype in children with ALL was observed.

Remission evaluation at precise time points showed correlation with certain genes – slower kinetics of leukemic blasts on day 15 of treatment, measured with flow cytometry, was detected in children with *TYMS* 6bp and 28 bp and *DHFR* -680 C>A and -317 A>G variants. Polymorphisms in tested genes did not influence the remission on day 33.

It has been shown that overall (clinical and laboratory) toxicity was more frequently manifested in children who received lower doses of MTX (2g/m² vs 5g/m²). The rate of toxic events was significantly more prevalent in the older children, with average age of ten years. Parenteral administration of MTX significantly more often leads to development of clinical adverse side effects in comparison to peroral MTX administration, where laboratory toxicity is more frequently observed, especially hepatotoxicity. The majority of adverse effects of MTX therapy were classified as low grade, according to precisely defined criteria. Considering PK monitoring, it has been proven that the most common irregularity in drug elimination was at the 48th hour after the MTX application and that in vast majority of children lasted less than 24 hours. In our study group c.677 T/T variant in the *MTHFR* gene showed to be protective parameter in patients who received lower doses of MTX: children with this polymorphism who received MTX in dosage of 2g/m² were less prone to toxic events. Correlation of PK and variants in the examined genes showed that children with *TYMS* 6bp D/D variant significantly often had increased MTX levels. Also, children with *MTHFR* c.1298 C/C, *DHFR* -675 G/G, -556 C/C and -464 T/T and *SLC19A1* c.80 A/A variants had greatly numbered toxic events after repeated exposures to higher doses of the MTX (5g/m²).

Overall survival of pediatric patients in the study was 87%. Among different factors that influenced the prognosis, variant -464 T/T in the *DHFR* gene stood out as the least favorable. Children with this polymorphism are significantly more likely to develop a relapse of the underlying disease, influencing their final outcome.

Conclusion: The dissertation contributes to the understanding of the mechanisms involved in the clinical and laboratory manifestation of toxicity during the MTX therapy. This research clarified certain aspects related to the role of the examined genetic variants in leukemogenesis and their association with the outcome of children with ALL. These results support the hypothesis that pharmacogenetic markers influence the occurrence and degree of toxicity during treatment with MTX. It also highlights the importance of

prevention of toxicity through the dose regimen modulation according to the genetic profile of the patient. The correlation of certain genetic variants with potential relapse of the disease classified examined polymorphisms as individual prognostic factors in pediatric patients with ALL.

Key words: pediatric acute lymphoblastic leukemia, genetic variants in *MTHFR*, *TYMS*, *SLAC19A1* i *DHFR* genes, methotrexate

Research area: pediatrics

Special topics: hematology, pharmacogenetics

Sadržaj

1. UVOD.....	16
1.1. Akutna limfoblastna leukemija u dece.....	16
1.1.2. Molekularna patogeneza ALL.....	16
1.1.3. Epidemiološke karakteristike ALL.....	18
1.1.4. Klasifikacija ALL.....	18
1.1.5. Klinička slika ALL.....	20
1.1.6. Liječenje ALL.....	21
1.1.7. Prognoza ALL.....	22
1.2. Farmakogenetika i farmakogenomika.....	22
1.2.1. Lek metotreksat (MTX).....	24
1.2.2. Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR).....	27
1.2.3. Dihidrofolat reduktaza (DHFR).....	28
1.2.4. SLC19A1 (solute carrier family 19 (folate transporter), member 1).....	30
1.2.5. Timidilat sintaza (TYMS).....	31
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	34
3. MATERIJAL I METODE.....	35
3.1. Ispitanici.....	35
3.2. Terapija metotreksatom, praćenje farmakokinetike i toksičnosti.....	36
3.3. Biološki materijal.....	37
3.3.1. Metode za izolaciju DNK.....	38
3.3.1.2. Izolacija DNK na kolonijama iz krvi ili kostne srži.....	38
3.3.1.3. Izolacija DNK na kolonijama sa razmaza krvi ili kostne srži.....	38
3.3.2. Metode za određivanje genetičkih varijanti.....	39
3.3.2.1. Analiza DNK fragmenata elektroforezom na agaroznom gelu.....	39
3.3.2.2. Analiza DNK fragmenata elektroforezom na poliakrilamidnom gelu.....	39
3.3.2.3. Određivanje genetičkih varijanti PCR metodom.....	40
3.3.2.4. Detekcija genetičkih varijanti PCR-RFLP metodom.....	41
3.3.2.5. Detekcija genetičkih varijanti alel-specifičnim PCR-om.....	41
3.3.2.6. Određivanje genetičkih varijacija sekvenciranjem PCR produkata.....	42

3.4. Statisti ka obrada podataka.....	44
4. REZULTATI.....	45
4.1. Klini ki i laboratorijski parametri na prezentaciji bolesti.....	45
4.2. Stratifikacija rizika prema standardnim i molekularno-genetskim parametrima prognoze.....	48
4.3. Pore enje pacijenata i kontrolne grupe u u estalosti polimorfizama u ispitivanim genima.....	51
4.4. Korelacija varijanti u ispitivanim genima sa standardnim i molekularno-genetskim parametrima prognoze.....	53
4.5. Korelacija varijanti u ispitivanim genima sa parametrima koji u estvuju u proceni odgovora na terapiju.....	60
4.6. Analiza geneti kih varijacija potencijalno važnih za toksi nost MTX.....	65
4.7. Distribucija pacijenata prema razli itom modalitetu terapije metotreksatom.....	67
4.8. Distribucija pacijenata u odnosu na ukupno ispoljenu toksi nost tokom terapije metotreksatom.....	68
4.9. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa ukupnom toksi noš u MTX.....	71
4.10. Distribucija pacijenata u odnosu na farmakokinetiku metotreksata.....	81
4.11. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima i PK MTX.....	83
4.12. Distribucija gradusa i tipa toksi nosti tokom primene MTX.....	89
4.13. Korelacija gradusa i tipa toksi nosti tokom primene MTX sa polimorfizmima u ispitivanim genima.....	92
4.14. Toksi nost tokom peroralne primene MTX.....	96
4.15. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa toksi noš u MTX u fazi održavanja.....	99
4.16. Preživljavanje dece sa ALL.....	105
4.17. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa OAS i EFS.....	108
4.18. Korelacija varijanti u ispitivanim genima sa OAS.....	111
5. DISKUSIJA.....	117
6. ZAKLJU CI.....	128

7. LITERATURA.....	130
Biografija autora.....	145
Izjava o autorstvu.....	146
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....	147
Izjava o koriš enju.....	148

1. UVOD

1.1. Akutna limfoblastna leukemija u dece

Leukemije su maligne klonalne bolesti hematopoetskog tkiva. Usled nekontrolisane proliferacije nezrelih i nediferentovanih blasta dolazi do potiskivanja normalnih elemenata koštane srži (1). Stvaranje blasta je deo procesa sazrevanja hematopoetskih i limfoidnih elemenata i u normalnim okolnostima njihov broj ne prelazi 5% u koštanoj srži. Te elije su primitivni prekursori, koji treba da prođu u brojne faze sazrevanja kako bi postale funkcionalne elije. Akutne leukemije nastaju kada se normalni elementi koštane srži nekontrolisano zamenjuju relativno nediferentovanim elijama, blastima (2).

Maligna transformacija se može odigrati na različitim stupnjevima diferencijacije hematopoetskih elija. Akutna limfoblastna leukemija (ALL) nastaje klonskom proliferacijom limfoblasta, nezrelih, prekursorskih elija limfoidne loze, koji su, prethodno, podlegli malignoj transformaciji (3).

1.1.2. Molekularna patogeneza ALL

Složene somatske mutacije limfoidne progenitorne elije na jednom ili više stupnjeva razvoja uslovljavaju nastanak ALL. Mutacije menjaju ključne funkcije elije, što za posledicu ima pojavu pojačane sposobnosti samoobnove, subverziju kontrole normalne proliferacije, blokiranje diferencijacije i povećanu rezistenciju na proces apoptoze (4). Strukturne hromozomske aberacije, kao mutageni događaji specifičnog tipa, mogu biti inicijalni događaji u leukemogenezi, ako se dogode u hromozomskom regionu u kojem je lociran neki od protoonkogeni. Rekombinacioni sistem, odgovoran za normalne somatske rearanžmane, povećava frekvencu aberantnih rekombinacionih događaja, što može dovesti do mutacije u genima uključenim u regulaciju tri važna elijska procesa: proliferacije, diferencijacije i/ili programirane elijske smrti (apoptoze), sa posledicom malignom transformacijom elije (5).

Od strukturalnih hromozomskih aberacija naj eš e su translokacije (oko polovine svih mutacija), a pored njih, klini ki su zna ajne i numerike aberacije, dok se uloga detektovanih delecija, kao potencijalnih prognosti kih faktora, još uvek ispituje. Geni, obuhva eni translokacijama detektovanim u ALL, kodiraju faktore rasta, njihove receptore, transkripcione faktore i proteine koji u estvuju u kompleksnoj regulatornoj mreži za kontrolu procesa rasta, proliferacije, migracije, adhezije, diferencijacije i programirane elijske smrti limfoidnih i mijeloidnih progenitora (6).

Postoje dva fundamentalno razli ita mehanizma kojim translokacije aktiviraju protoonkogene:

Prvi je pove ana ekspresija normalnog proteinskog produkta protoonkogenena. Translokacije naj eš e zahvataju proto-onkogene, što ima za posledicu njihovo dovo enje u blizinu regulatornih elemenata koji aktiviraju transkripciju (7).

Drugi mehanizam je stvaranje novog, fuzionog proteina, sa promenjenom funkcijom. Translokacija dovodi do fuzije (spajanja) delova dva razli ita gena koja stvaraju himerni transkripcioni faktor sa osobinama onkogenena. Transkripcioni faktori se vezuju za DNK i intereaguju sa nuklearnim proteinima, koji su regulatori transkripcije gena (8).

Kada je imunofenotipizacija postala jedan od osnovnih kriterijuma za subdijagnostiku ALL, vremenom je uo ena korelacija izme u pojave strukturalnih aberacija i odre enog imunofenotipa. Danas je pojava odre enih strukturalnih aberacija u odnosu na imunofenotip deli na: rearanžmane koji su usko povezani sa B elijskom linijom, rearanžmane koji su povezani sa T elijskom linijom i rearanžmane ija pojava nije asocirana sa odre enom elijskom linijom (9).

U oko 90% dece sa ALL vi ene brojne citogenetske aberacije u kariotipu, dok je u isto vreme incidenca ALL ve a u dece sa konstitucionalnim hromozomskim anomalijama (10). Studije ukazuju na pove an rizik od nastanka ALL u dece sa odre enim genetskim sindromima (*Down*, Neurofibromatoza tip I, *Bloom*, Ataksija telangiektazija, *Schwachman*) (11).

1.1.3. Epidemiološke karakteristike ALL

Akutne leukemije (AL) su naju estaliji malignitet u uzrastu do 15 godina, sa incidencom od 35%. Od svih obolelih od AL u ¾ dece se dijagnostikuje ALL (12).

Incidenca ALL je najve a izme u 1. i 4. godine, sa karakteristi nim pikom izme u 2. i 3. godine života, kada iznosi oko 80/milion, dok se izme u 8 i 10 godine, incidenca smanjuje na 20/milion dece (13).

Ne postoji jednaka geografska distribucija ALL. Postoje odstupanja u incidenci u pojedinim zemljama, ak i u regionima odre enih zemalja. Na primeru Velike Britanije je vi eno da je viša incidenca ALL u razvijenijim gradovima, dok je u ruralnom delu zemlje (*Scotland, Wales*) niža (14).

Zahvaljuju i zbirnim epidemiološkim studijama, izveden je zaklju ak o parcijalnim etiološkim iniocima ALL, u koje spadaju izolacija, visok ekonomski status, migracija i mešanje populacije (15).

Distribucija ALL me u polovima je 1:1, odnosno 1,3:1 u korist de aka u adolescentskom uzrastu, sa izuzetkom odoja kog perioda, gde je prisutna dominacija ženskog pola (16).

1.1.4. Klasifikacija ALL

Prema toku bolesti i dužini preživljavanja leukemije se dele na akutne i hroni ne. Akutne se karakterišu klonalnom ekspanzijom nezrelih hematopoetskih ili limfoidnih prekursora, dok je za hroni ne leukemije specifi na ekspanzija zrelijih elemenata koštane srži (17).

Uvo enjem citohemijskih bojenja, u drugoj polovini prošlog veka, nastala je primarna podela akutnih leukemija prema predominantoj elijskoj liniji, na limfoblastne i mijeloblastne (18).

Me unarodno prihva ena morfološka klasifikacija blasta po Francusko-Ameri ko-Britanskoj (engl. *French-American-British* – FAB) kooperativnoj grupi deli blaste na L1, L2 i L3 podtipove. L1 podtip je zastupljen u oko 90% ALL, L2 u oko 8%, dok L3 podtip izuzetno redak i zahteva druga iji terapijski pristup (19).

Sredinom 70-tih godina prošlog veka je napravljena dodatna kategorizacija blasta, bazirana na ekspresiji površinskih ili citoplazmatskih T-lijeskijh antigena (Ag), koji se danas nazivaju i markerima i to je momenat kada imunofenotipizacija (engl. *Immunophenotyping* – IPH) postaje rutinska dijagnostička metoda. Određivanje zastupljenosti karakterističnih Ag na leukemijskim T-lijekama ili u njima, daje prisustvo ili odsustvo daje zbirnu informaciju o lozi od koje su maligne T-lijekije potekle i o stepenu sazrevanja i diferencijacije na kome je maligna alteracija zaustavila prirodan tok ovih procesa. Blasti su na osnovu fenotipa podeljeni u tri osnovne grupe: zrele B, B i T progenitorsku ALL, a potom zavisno od stupnja diferencijacije T ili B limfoblasta koji je podlegao malignoj transformaciji na: pre-pre-B-ALL, pre-B-ALL, pre-T-ALL i T-ALL. Zahvaljujući uvođenju ove metode je shvaćeno da deca različitog IPH imaju drugačije kliničke karakteristike i ishod bolesti, zbog čega je potrebno usmeravati terapiju prema B odnosno T T-lijeskom fenotipu, sa izuzetkom zrele B ALL koja predstavlja poseban entitet zbog visokog stepena diferencijacije leukoblasta (20). Istorijski se IPH određivao ručnim bojenjima, dok se decenijama unazad koristi protočna citometrija (engl. *Flow cytometry* – FC). Danas se FC ne koristi samo u dijagnostici IPH, već ima važnu ulogu i u praćenju odgovora na terapiju, u vidu preciznog merenja minimalne rezidualne bolesti (engl. *Minimal residual disease* – MRD). Postojeće metode detekcije MRD su u stanju da identifikuju pacijente sa povećanim rizikom recidiva ALL, što omogućuje intenzifikaciju terapije u odnosu na izmerenu vrednost MRD i danas su sastavni deo stratifikacije rizika savremenih protokola za lečenje ALL (21).

Klasičnim citogenetskim analizama mogu se detektovati aberacije u broju (numerične) i strukturi hromozoma (strukturalne aberacije) u oko 60-85% dece sa ALL u optimalnim uslovima, ali je glavna poteškoća loš mitotski indeks i loš kvalitet metafaza, izmenjen broj, što obara procenat detekcije na oko 50% (22). U numeričke aberacije spadaju: hiperdiploidija (faktor dobre prognoze), hipodiploidija (loš prognostički marker), pseudodiploidija i “near haploid”. Pod pojmom strukturalnih aberacija podrazumevaju se translokacije, inverzije, delecije (23). Konvencionalna citogenetska analiza je jednostavna tehnika koja predstavlja zlatni standard u dijagnostici. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl. *Fluorescence in situ hybridization* – FISH) se bazira na vizualizaciji specifičnih DNK proba koje su obeležene fluorescentnim

markerima, u odnosu na njihove komplementarne sekvence u ciljnom genomu. Udruženom analizom klasi nog kariotipa i FISH-a, stepen detekcije hromozomskih aberacija je, prema rezultatima brojnih studija, zna ajno viši (82% vs 91%) (24).

Klasifikacija ALL po MIC standardu, prema morfologiji (M), imunofenotipu (I) i citogenetici (C) je tokom dve dekade predstavljala osnovu za dijagnozu i podelu ALL, kao i za odabir terapijskih modaliteta. Me utim, danas je neophodna dopuna metodama molekularne genetike. Primena ovih metoda je dovela do izolacije brojnih onkogeni i tumor supresorskih gena zna ajnih za mehanizam leukemogeneze (25). Lan ana reakcija umnožavanja (engl. *Polymerase chain reaction* – PCR) predstavlja senzitivnu i lako primenljivu metodu, zasnovanu na izolaciji DNK ili RNK iz koštane srži. PCR-om se mogu detektovati fuzioni transkripti, geni receptora za antigen, spojni regioni u rearanžmanima teškog lanca imunoglobulina (engl. *Immunoglobuline heavy chain* – IgH) i gena za T elijski receptor (engl. *T cell receptor* – TCR) i mutacije u tumor supresor genima i onkogenima (26). Genetske aberacije, pored kvantifikacije rezidualnih blasta, predstavljaju, jedan od najbitnijih elemenata za pra enje MRD. Rezultati brojnih studija ukazuju na ovakav zna aj pra enja MRD tokom le enja, naro ito u indukcionoj fazi, jer se stvaraju uslovi za direktno usmeravanje terapije, ime se postiže ve i procenat klini ke i molekularne remisije (27, 28). Kao nezavisni prognosti ki faktor MRD omogu ava stratifikaciju novih grupa rizika i pruža osnovu za potpuno individualni terapijski pristup. Selekcija bolesnika, prema njihovom genetskom profilu bolesti, omogu ava podelu na grupu koja zahteva intenzifikaciju terapije i na grupu gde se primenjuju standardni protokoli le enja u redukovanim dozama, ime se ne kompromituje terapijski ishod, a izbegava se izlaganje mnogim toksi nim dejstvima citostatika (29).

1.1.5. Klini ka slika ALL

Klini ka slika na dijagnozi bolesti može imati dramati nu, vrlo umerenu i skoro neprimetnu simptomatologiju, zavisno od stepena proliferacije malignog klona u koštanoj srži i drugim tkivima i organima (30).

Hematološki znaci bolesti: anemija, neutropenija i trombocitopenija se javljaju usled potiskivanja normalnog hematopoetskog tkiva kostne srži leukoblastima, što za

posledicu ima malaksalost, vrtoglavicu, bledilo kože, sklonost ka infekcijama i krvarenja koja su naj eš e manifestuju u koži i vidljivim sluzokožama.

Bolovi u zglobovima i kostima se javljaju u oko 25% dece, a posledica su leukemijske infiltracije sinovija i periosta.

Limfadenopatija, uve anje medijastinuma, hepatomegalija i splenomegalija su znak ekstramedularne bolesti, a ekstramedularna ekspanzija malignih elija može dovesti i do disfunkcije razli itih organa.

Neurološki simptomi mogu biti posledica infiltracije centralnog nervnog sistema (CNS), koja može biti i potpuno asimptomatska (31).

Inicijalna zahva enost testisa kod de aka i ovarijuma kod devoj ica se retko vi a na dijagnozi.

1.1.6. Le enje ALL

Savremeni protokoli podrazumevaju kombinaciju razli itih citostatika i u manjoj meri lekova koji nisu citostatski agensi (32). U svetu postoji nekoliko internacionalnih grupa, ije zemlje lanice uniformno primenjuju protokole koji se delimi no razlikuju u stratifikaciji rizika i intenzifikaciji terapije (33). U ve ini centara se sprovode randomizovane studije sa ciljem konstruisanja novih protokola koji e u budu nosti postizati ve i procenat dugotrajne remisije i imati manji stepen toksi nost (34).

Protokoli se sastoje od nekoliko ciklusa le enja:

Indukcija ima za cilj postizanje kompletne remisije (engl. *Complete remission* – CR) i uspostavljanje normalne hematopoeze. Sastoji od dve faze, a oko 95% bolesnika u e u CR nakon prve faze le enja (35). Tokom indukcionog ciklusa, postoji nekoliko procena odgovora na terapiju, na osnovu kojih se vrši stratifikacija rizi nih grupa.

Konsolidacija ili intenzifikacija podrazumeva sistemsku terapiju radi spre avanja nastanka recidiva bolesti. U odnosu na imunofenotip vrši se optimalno doziranje citostatskih agenasa (36).

Reindukcija se, u zavisnosti od primenjenog protokola, može razlikovati u odnosu na granu randomizacije ili prema prethodno izvršenoj stratifikaciji rizika.

Terapija održavanja po inje da se primenjuje nakon intenzivne faze le enja, u cilju eradikacije eventualnih rezidualnih leukemijskih elija, vrlo verovatno rezistentnih na prethodno ordiniranu hemioterapiju. Zaključno sa terapijom održavanja terapijski protokol traje 104 nedelje.

CNS profilaksa i usmerena terapija se primenjuju se tokom svih faza le enja. Sastoj se od intratekalne primene jednog ili više citostatika (zavisno od grupe rizika) i/ili zra enja endokranijuma, što tako e zavisi od grupe rizika i imunofenotipa (37).

Profilaksa oportunističkih infekcija, suportivna terapija i kauzalna terapija razli itih stanja izazvanih hemioterapijom ili stanja koja su posledica osnovne bolesti, ine sastavni deo savremenih protokola.

1.1.7. Prognoza ALL

Bolest se skoro uniformno završavala letalnim ishodom do '60-tih godina prošlog veka, od kada se, zahvaljuju i primeni i usavršenoj kombinaciji novih lekova, ishod dramatično poboljšao (38). Savremene dijagnostičke metode, koje uključuju genetski profil pacijenta i precizniju stratifikaciju rizika, dovele su do individualizacije terapije, ime je postignuta dugogodišnja stopa preživljavanja od blizu 90%. Koncept personalizovanog le enja, pored boljeg preživljavanja, ima za cilj redukciju toksičnih efekata i bolji kvalitet života tokom i nakon završetka terapije (39).

1.2. Farmakogenetika i farmakogenomika

Farmakogenetika (engl. *Pharmacogenetics* – PG) spaja farmakodinamiku (istražuje dejstvo lekova na organizam), farmakokinetiku (ispituje metabolizam lekova) i genetiku (izučava gene, njihove varijacije i nasledne karakteristike organizma). Termin farmakogenetika se koristi kada se govori o varijacijama u jednom ili malom broju gena koje utiču na odgovor na terapiju jednim lekom, dok se termin farmakogenomika koristi kada posmatramo uticaj velikog broja gena ili značajnog dela genoma na odgovor na le enje jednog ili više lekova (40).

Primer je da ljudi sli ne telesne mase, godina, pola i iste etni ke pripadnosti mogu razli ito da reaguju na jednake doze istog leka. Pojedine osobe mogu da imaju prenaplašena neželjena dejstva lekova, dok se kod drugih ne postiže optimalan terapijski efekat. Pored polnih, uzrasnih i razlika u opštem zdravstvenom stanju, ove razlike mogu biti uslovljene individualnim razlikama u geneti kom materijalu (41). Naj eš e geneti ke razlike, koje uzrokuju interindividualan odgovor na odre ene lekove, mogu biti varijacije nukleotidnog sastava (engl. *single nucleotide variation* – SNV), varijacije u broju tandemskih ponovaka ili insercija, odnosno delecija nukleotidnih sekvenci. Koriste i individualne geneti ke karakteristike može se predvideti osobeni odgovor na terapiju. Geneti ke varijacije od interesa se obi no nalaze u genima koji kodiraju proteine važne za metabolizam i transport samog leka ili predstavljaju metu medikamenta. Uticaj se ostvaruje preko ekspresije, strukture, stabilnosti i aktivnosti proteina kojeg kodiraju. Aktivnost nekih enzima koji metabolišu lekove može se razlikovati i više od 1000 puta izme u ljudi koji pripadaju istoj populaciji (40).

Cilj farmakogenomike je da uspostavi uzro no-posledi nu vezu izme u odre enih geneti kih varijacija kod oveka i efekta leka na njegov organizam. Od suštinskog je zna aja mogu nost predikcije odgovora na terapiju (efikasnost i toksi nost leka) i personalizacija (modifikacija doze leka) u skladu sa prisustvom geneti kih varijanti i karakteristikama pacijenta. Geneti ke varijacije koje u estvuju u indivizualizaciji terapije predstavljaju farmakogenomi ke markere.

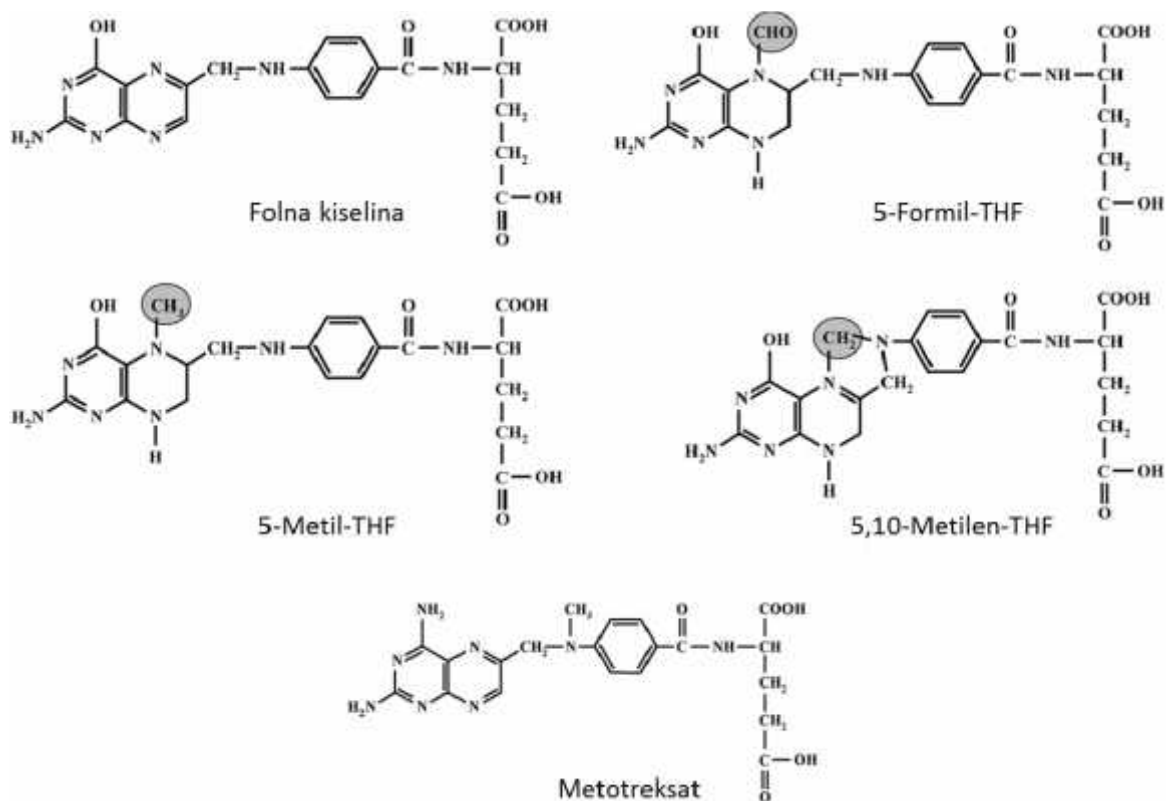
Prilikom individualizacije terapije pitanje doze leka nije uvek primarno. Primer za to su citostatski agensi koji se koriste u terapiji malignih bolesti, koji ciljano deluju na odre eni ciklus u eliji koji maligne elije koriste za svoju propagaciju. Maligne bolesti u kancerogenezi imaju geneti ku etiologiju, zbog ega su odre ene vrste raka podložne ciljanoj geneti koj terapiji na osnovu analize obrasca genske ekspresije maligne elije. Jedan od najboljih primera je anti-tumorski lek trastuzumab se koristi u le enju raka dojke samo kod pacijentkinja koje imaju prekomerno ekspimiran *HER2* gen (42). Tako e, inhibitor tirozin kinaze (*imatinib mesylate*) je lek izbora kod pacijenata sa BCR/ABL fuzionim transkriptom [t(9;22)(q34;q11)], poznatijim kao Filadelfija hromozom. Pomenuti lekovi su primer ciljane terapije i kao antitela blokiraju

receptor/površinski protein visoko specifično, čime poboljšavaju procenat preživljavanja (43).

1.2.1. Metotreksat

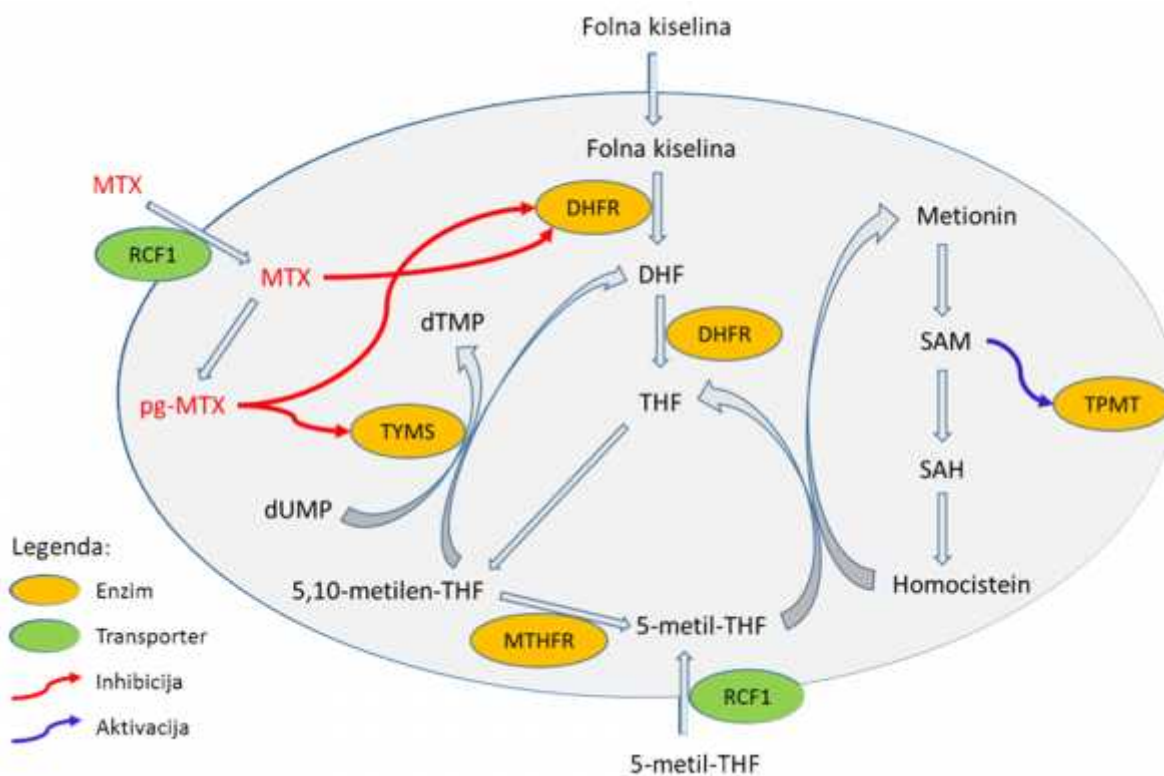
Pre više od 65 godina je opisana remisija kod dece obolele od ALL nakon upotrebe antagonista folata (44). Prvi antifolatni agensi su bili analozi folata aminopterin i njegov homolog 4-amino-10-metilfolna kiselina poznatija kao metotreksat (engl. *Methotrexate* – MTX). Danas se MTX koristi u lečenju miliona pacijenata obolelih od različitih malignih, inflamatornih i autoimunih bolesti (45).

MTX inhibira ključni enzim u metabolizmu folata, dihidrofolat reduktazu (DHFR) mehanizmom kompetitivne inhibicije. MTX se vrlo veže za enzim DHFR, skoro ireverzibilno, onemogućavajući i vezivanje prirodnih supstrata. DHFR enzim obnavlja rezerve redukovane forme folata tako što prevodi folnu kiselinu i dihidrofolat (DHF) u tetrahidrofolat (THF). Postoji više aktivnih formi folata (Slika 1), 5,10-metilen-THF, 10-formil-THF i 5-metil-THF koje u ćeliji služe kao donori monokarbonskih jedinica - metilen, formil i metil grupa. Koriste se za sintezu timidilata u reakciji koju katalizuje enzim timidilat sintaza (TYMS), za sintezu purina uz pomoć enzima glicinamid ribonukleotid (GAR) transamilaze i aminoimidazol karboksamid ribonukleotid (AICAR) transformilaze, kao i za prevođenje homocisteina u metionin (Slika 2). Metionin je prekursor S-adenozilmetionina (SAM), koji se koristi za reakcije metilacije, uključujući i metilaciju dezoksiribonukleinske kiseline (DNK). Nedostatak THF inhibira ove procese u ćeliji nakon čega dolazi do spremanja sinteze DNK, smanjenja DNK metilacije, porasta koncentracije homocisteina i konačno smrti same ćelije (46).



Slika 1. Hemijske strukture folne kiseline, redukovanih folata (sa istaknutim aktivnim grupama) i strukturnog analoga folata – MTX. Preuzeto i modifikovano iz rada Yehuda G. Assaraf-a iz 2006 godine (46).

Folati predstavljaju derivate vitamina B9 koji elije sisara ne mogu da sintetišu, ve ih unose hranom. Folati vrlo slabo difunduju kroz elijsku membranu, zbog ega ih prenose specifi ni transporteri. Transporter redukovanih folata (RFC1) unosi u eliju i prirodne folate i MTX (47). Nakon unosa folata i MTX u eliju, dolazi do procesa poliglutamacije – dodatak enzimski katalizovanih glutamatnih jedinica. Na ovaj na in se prirodni i anti-folati zadržavaju u eliji i pove ava im se afinitet za enzime folatnog puta. MTX u poliglutamatnoj formi se efikasnije vezuje i tako inhibira enzime folatnog puta: DHFR, AICAR transformilazu i TYMS (46, 48) (Slika 2).



Slika 2. Metaboli ki put folata i njegova inhibicija lekom MTX-om. DHF – dihidrofolat, DHFR – dihidrofolat reduktaza, dTMP – deoksitimidinmonofosfat, dUMP – deoksiuridinmonofosfat MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza, pg-MTX – poliglutamatna forma MTX-a, RCF1 – transporter redukovanih folata, SAM – S-adenozilmetionin, SAH – S-adenozilhomocistein THF – tetrahidrofolat, TPMT – tiopurin S-metiltransferaza. Preuzeto i modifikovano iz rada Yehuda G. Assaraf-a iz 2006 godine (46).

MTX je jedan od ključnih lekova u terapijskim protokolima za pedijatrijsku ALL. Potencijalno značajne genetičke varijacije za individualizaciju terapije MTX nalaze se u genima: metilentetrahidrofolat reduktazi (*MTHFR*), dihidrofolat reduktazi (*DHFR*), transporteru redukovanih folata (engl. *solute carrier family 19 (folate transporter) member 1 – SLC19A1*) i timidilat sintetazi (*TYMS*).

1.2.2. Metilentetrahidrofolat reduktaza

Gen *MTHFR* se nalazi na kratkom kraku prvog hromozoma i kodira istoimeni enzim koji katalizuje ireverzibilno prevoenje 5,10-metilen-THF-a u 5-metil-THF. Kofaktor 5-metil-THF je neophodan za prevoenje homocisteina u metionin. Metionin podleže S-adenilaciji i formira SAM. SAM je glavni donor metil grupe u svim reakcijama metilacije u eliji, ukljuuju i metilaciju i proteina i DNK (49).

Manjak 5-metil-THF-a utie na poveenje nivoa homocisteina u krvi – homocisteinemiju. Koliina homocisteina u plazmi je obrnuto srazmerna nivou folata i vitamina B12, a zavisi i od uzrasta, pola, kao i od varijacija u genu *MTHFR* (50).

Do danas su najviše izuavane dve relativno este nesinonimne nukleotidne zamene u genu *MTHFR*. Varijacija *MTHFR* c.677 C>T dovodi do zamene aminokiseline alanin u valin na poziciji 222 *MTHFR* enzima i tako zna ajno utie na smanjenje njegove aktivnosti, kao i na homocisteinemiju (51). Blaže smanjenje aktivnosti *MTHFR* enzima i razvoj umerenije homocisteinemije uzrokuje *MTHFR* c.1298 A>C varijacija, koja uslovljava zamenu aminokiseline glutamin u alanin na poziciji 429 na *MTHFR* proteinu (52). Preciznije, *MTHFR* c.677TT genotip dovodi do smanjenja aktivnosti *MTHFR* enzima za oko 65%, *MTHFR* c.1298CC za oko 40%, dok heterozigoti za ove dve varijacije imaju za 40-50% smanjenu *MTHFR* aktivnost (53, 54).

Varijacije u genu *MTHFR* i homocisteinemija su najviše prou avane u kontekstu etiologije kardiovaskularnih bolesti (KVB), na prvom mestu ateroskleroze i tromboze. Homocisteinemija predstavlja faktor rizika za KVB jer uzrokuje oksidativni stres, ošteenje tkiva i inflamaciju (49). Budu i da varijantni aleli gena *MTHFR* uzrokuju poveenje nivoa homocisteina, oni su povezani sa poveanim rizikom od KVB (55).

Od gena koji kodiraju enzime folatnog puta, *MTHFR* je najviše prou avan kao leukemogeni faktor. Pojedini autori ukazuju na asocijaciju *MTHFR* c.677 C>T varijacije sa pojavom ALL (56). Zanimljivi su navodi u literaturi koji su pokazali da nefunkcionalni *MTHFR* c.677T alel ima protektivni efekat, odnosno da nosioci ovog alela imaju manju verovatno u da razviju ALL. Ovaj nalaz se objašnjava injenicom da nosioci *MTHFR* c.677T alela imaju više dostupan metilen-THF za sintezu dTMP od dUMP. Kod

nefunkcionalnog MTHFR alela, dUTP se manje ugrađuje u DNK, samim tim je i manje oštećeno, što dovodi do manje incidence raka (57).

Poseban osvrt u literaturi je značaj genetičkih varijacija *MTHFR* c.677 C>T i *MTHFR* c.1298 A>C u toksičnosti i efikasnosti terapije MTX. Pojedini autori ukazuju da *MTHFR* c.677T varijanta povećava rizik od recidiva kod ALL pacijenata (58, 59). Primena MTX smanjuje aktivnosti enzima MTHFR, čime se povećava koncentracija 5,10 metilen-THF-a, što dovodi do povećanog rizika od recidiva bolesti. Ova forma folata je neophodna za sintezu dTMP i DNK, što je u suprotnosti sa citotoksičnim efektom leka MTX (58).

MTHFR je izuzetno važan i kao farmakogenomski marker tokom terapije 6-merkaptopurinom (6-MP). Aktivnost enzima tiopurin s-metiltransferaze (TPMT), važnog za metabolizam 6-MP, zavisi od koncentracije njegovog kofaktora SAM (60, 61). Koncentracija kofaktora, sa druge strane, zavisi od aktivnosti MTHFR enzima. Tako se najviša aktivnost enzima TPMT otkriva kod pacijenata koji nose funkcionalne alele oba gena. Pokazano je da pacijenti sa ALL, sa *MTHFR* alelima, koji uslovljavaju smanjenu aktivnost MTHFR enzima, imaju povećani rizik za razvoj hematotoksičnosti i infekcija. Takođe, primećeno je da su pacijenti sa alelima koji uslovljavaju smanjenu aktivnost enzima TPMT i MTHFR u najvećem riziku da ispolje toksičnost 6-MP (62).

1.2.3. Dihidrofolat reduktaza (DHFR)

Gen *DHFR* se nalazi na dugom kraku hromozoma 5 i kodira istoimeni enzim. Regulatorni transkript je kodiran DNK sekvencom koja se nalazi uzvodno od glavnog, protein-kodirajućeg DNK regiona. Identifikovano je više transkripata ovog gena, od kojih se najveći deo prevodi u proteine, dok manji deo ima regulatornu ulogu. Interesantno je da je na ovom više pseudogena na različitim hromozomima (63).

DHFR enzim ima ključnu ulogu u metabolizmu monokarbonskih grupa, koja se ostvaruje katalizacijom prevođenja oksidovanih, neaktivnih formi folata, folne kiseline i dihidrofolata, u aktivnu, redukovanu formu THF. Za ovu reakciju se troši redukovani NADPH koenzim, koji se za uzvrat, prevodi u oksidovanu formu. THF služi kao polazni supstrat za sintezu ostalih aktivnih formi folata, 5-metil-THF, 5,10-metilen-THF i 10-

formil-THF koji služe za remetilaciju homocisteina u metionin, sintezu timidilata iz uridilata i *de novo* sintezu purina. Zbog pobrojanih uloga u eliji, nedostatak DHFR enzima je patogenetski faktor u nastanku razli itih bolesti. U odnosu na u eš e u sintezi DNK, inhibitori ovog enzima mogu da se koriste kao antibiotici, antikancerogeni i antiinflamatorni agensi (46, 64).

Gen *DHFR* je izrazito varijabilan – funkcionalne varijacije su na ene u svim regionima ovog gena, bez obzira na injenicu da je manje izu avan od drugih gena koji kodiraju enzime folatnog puta, kao što su *MTHFR* i *TYMS*. Najviše prou ena varijacija u ovom genu je delecija od 19bp u prvom intronu koja uti e na pove anu ekspresiju gena *DHFR* (65) i pove anje koncentracije folata, a smanjenje koncentracije homocisteina u plazmi (66). Varijacije u promotoru nekodiraju eg transkripta, na pozicijama -680 i -317 u odnosu na po etak transkripcije regulatornog transkripta, uti u na ekspresiju *DHFR* gena (67).

Odgovaraju i unos i metabolizam folata obezbe uje adekvatnu DNK sintezu i DNK metilaciju. Nedovoljna aktivnost klju nog enzima u folatnom putu, DHFR enzima, dovodi se u vezu sa pojavom razli itih bolesti. Zatvaranje neuralne tube tokom embrionalnog razvoja zahteva intenzivnu proliferaciju elija, pa je potreba za aktivnim formama folata u eliji pove ana. Tako je na eno da *DHFR* alel povezan sa visokom *DHFR* ekspresijom štiti od defekta neuralne tube (engl. *Neural tube defect* – NTD) (68). Ono što je zanimljivo je da se štetnost ne ogleda samo u nedostatku, nego i u višku aktivnih formi folata. Pokazano je da su žene sa genotipom povezanim sa visokom *DHFR* ekspresijom u ve em riziku da obole od raka dojke ukoliko koriste multivitaminske suplemente koji sadrže ve u koli inu folne kiseline (65).

DHFR enzim je glavna meta razli itih anti-folatnih agenasa, uklju uju i i MTX. Ovaj lek se ireverzibilno vezuje za DHFR enzim i na taj na in ga inhibira. Ve a koli ina ovog enzima u eliji bi mogla da smanji toksi nost izazvanu ovim lekom, ali i da ugrozi terapijski efekat samog leka. Na primer, u 3'UTR gena *DHFR* je identifikovana varijanta koja smanjuje afinitet siRNK za *DHFR* transkript i tako uti e na pove anje *DHFR* ekspresije, što za posledicu ima loš odgovor na MTX (69). Tako e, kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA), koji su nosioci *DHFR* -317AA genotipa, pokazana je slabija efikasnost MTX, bez uticaja na toksi nost leka (70). Isti genotip, *DHFR* -317AA,

udružen sa genotipom *DHFR* -1610CC, doveden je u vezu sa smanjenjem preživljavanjem bez pojave drugih događaja (engl. *Event-free survival* – EFS) (67). Takođe, u studiji sa ALL pacijentima, viđeno je da je *DHFR* -317GG genotip povezan sa većim procentom recidiva osnovne bolesti (71). Objavljeno je i da genetička varijanta povezana sa povećanom ekspresijom, delecija od 19bp u intronu 1 gena *DHFR*, utiče na povećanje hepatotoksičnosti kod adultnih pacijenata sa ALL tokom terapije MTX (72). Različiti rezultati otvaraju put daljim istraživanjima brojnih varijacija u genu *DHFR* i njihovom značenju u odgovore na terapiju MTX.

SLC19A1 (eng. solute carrier family 19 (folate transporter), member 1)

Gen *SLC19A1* je lociran na dugom kraku hromozoma 21 i kodira redukovani nosač folata (engl. *Reduce folate carrier 1* – RFC1) transporter. Folati kao hidrofilni molekuli koji su u formi anjona na fiziološkim pH vrednostima, kroz ćelijske membrane vrlo teško prolaze difuzijom. Glavni put unosa folata se obavlja aktivnim transportom pomoću folatnih transportera, u koje spada i RFC1 (47).

RFC1 je široko eksprimiran u humanim tkivima i smatra se najvažnijim transportnim sistemom za unos folata u ćelije sisara. Najzastupljenija forma folata u cirkulaciji je 5-metil-THF, koji se kao i MTX efikasno unosi u ćeliju RFC1 transporterom, nasuprot folnoj kiselini, oksidovanoj formi folata, koja se na isti način prenosi sa manjim afinitetom (47, 73).

Najvažnija, a samim tim i najviše istražena varijacija u genu *SLC19A1* je SNV *SLC19A1* c.80 G>A koja se nalazi u kodonu 27 i utiče na zamenu arginina histidinom u proteinu. Varijantni alel c.80A utiče na povišeni nivo folata i homocisteina u plazmi (74). Smatra se da ova varijacija smanjuje efikasnost prenosa kako prirodnih folata, tako i MTX, mehanizam funkcionalni značaj i mehanizam još uvek nisu sasvim razjašnjeni (75). Kao rezultat prisustva ove genetičke varijante, može da dođe do promene u kinetici RFC1 supstrata i na taj način ova genetička varijanta učestvuje u nastanku određenih bolesti, modulira efikasnost i utiče na toksičnost MTX.

Budući da ima važnu fiziološku funkciju, smanjena aktivnost RFC1 transportera može da dovede do oboljenja koja se dovode u vezu sa manjkom folata u ćelijama, kao

što su KV, neurološke i maligne bolesti. Pokazano je da homozigotni nosioci manje funkcionalnog *SLC19A1* c.80A alela imaju povećan rizik za obolevanje od raka želuca i jednjaka (76), ali smanjen rizik za nastanak raka glave i vrata (77). U literaturi se nalaze opretni rezultati i što se tiče prisustva genetičke varijante *SLC19A1* c.80A i rizika za nastanak ALL kod dece. U jednoj studiji je objavljeno da od svih poznatih genetičkih varijacija povezanim sa folatnim putem prisustvo *SLC19A1* c.80AA genotipa nosi najveći rizik za razvoj ALL (78), dok je druga studija pokazala suprotne rezultate, odnosno protektivni efekat *SLC19A1* c.80AA genotipa (79).

Predmet istraživanja je bio i farmakogenomski značaj *SLC19A1* c.80 G>A varijacije. Pacijenti sa *SLC19A1* c.80AA genotipom tokom primene MTX, usled smanjene aktivnosti RFC1 transportera imaju povećanu koncentraciju ovog leka u plazmi, što može da utiče na efikasnost lečenja (75). U literaturi se objavljeni podaci da su deca obolela od ALL koja nose *SLC19A1* c.80AA genotip u većem riziku od razvoja recidiva bolesti i sledstveno imaju lošiju prognozu (75, 80). Međutim, skorašnja meta-studija je pokazala da ova genetička varijacija nije dobar marker za predikciju toksičnosti tokom primene MTX u dece obolele od ALL (81).

1.2.5. Timidilat sintetaza (TYMS)

Gen *TYMS* nalazi se na kratkom kraku hromozoma 18. TYMS enzim katalizuje prevođenje dUMP (uridin monofosfat) u dTMP (timidin monofosfat), nukleotid koji je neophodan za DNK replikaciju i popravku DNK. Za ovu reakciju je neophodno prisustvo folatnog kofaktora, 5,10-metilen-THF-a, koji se u ovom koraku oksiduje do dihidrofolata. Zbog važne funkcije koju enzim TYMS obavlja u ćelijama koje se brzo dele, inhibicija ovog enzima je od interesa u lečenju različitih vrsta malignih i inflamatornih bolesti. Među inhibitorima TYMS enzima su analozi pirimidina, fluoropirimidini i folatni analozi, u koje spada i MTX (82, 83).

Aktivnost TYMS enzima zavisi od genetičkih varijacija u genu *TYMS*. Do sada su najviše poznate varijacije u 5'UTR i 3'UTR regionima (engl. *Untranslated region* – UTR). Ovi regioni okružuju kodirajuću sekvencu informacione RNK (iRNK), čime utiču na njenu stabilnost ili na efikasnost translacije (84).

U 5'UTR regionu gena *TYMS* se nalazi minisatelitski region koga čine ponovci dugački 28 baznih parova (bp). Najčešće se nalaze 3 ili 2, mada su višeni aleli sa 4 ili više ponovaka. Iako mehanizam nije sasvim jasan, pokazano je da alel sa 2 ponovka (2R) uslovljava slabiju translaciju *TYMS*-a u odnosu na alel sa 3 ponovka (3R) (85).

U 3'UTR regionu gena *TYMS* se nalazi indel dugački 6bp, odnosno genetička varijacija gde jedan alel na određenom lokusu ima umetnutu (insertovanu), određenu sekvencu, dok je kod drugog alela ta sekvenca izbačena (deletirana). U normalnoj alel sadrži sekvencu od 6bp, 5' – TTAAAG – 3', dok je kod referentnog alela ova sekvenca odsutna. Alel sa deletiranom sekvencom uslovljava slabiju ekspresiju gena, verovatno usled smanjene stabilnosti mRNA (86). Međutim, zanimljivo je da se alel iz 5'UTR regiona *TYMS* gena, koji uslovljava povećanu ekspresiju (3R), obično nasleđuje sa alelom iz 3'UTR regiona koji uslovljava smanjenu ekspresiju (6bp-) i *vice versa* (87).

Za nosioce alela koji utiču na smanjenu *TYMS* ekspresiju se očekuje da u svojoj DNK imaju povećan sadržaj deoksiuridinskih nukleotida. Stoga postoji povećana verovatnoća da se ovi nukleotidi pogrešno ugrade u DNK prilikom DNK replikacije ili popravke DNK. Ovakva oštećenja DNK mogu uzrokovati pojavu malignih oboljenja, pa se može očekivati da genetičke varijante koje se dovode u vezu sa smanjenom ekspresijom gena *TYMS* budu faktori rizika za kancerogenezu. Jedan broj studija je ukazao da postoji povećan rizik za nastanak malignih oboljenja kod nosioca *TYMS* 2R alela, sa druge strane brojniji navodi iz literature to nisu potvrdili, dok su rezultati pojedinih autora pokazali upravo suprotno (78). Kada je proučavan uticaj 6bp indel promene u 3'UTR regionu gena *TYMS* na rizik za nastanak malignih oboljenja rezultati su takođe bili kontroverzni (57, 83).

Farmakogenomski značaj varijacija u genu *TYMS* tokom lečenja pacijenata obolelih od različitih malignih i autoimunih bolesti antifolatnim i fluorouridinskim lekovima je već neko vreme u fokusu istraživanja. MTX, posebno u poliglutamatoj formi, kao i lek 5-fluorouracil direktno se vezuju za *TYMS* enzim i tako ga inhibiraju (48). Ukoliko je ćelija prirodno bogatija enzimom, što je posledica prisustva *TYMS* alela koji uslovljavaju povećanu gensku ekspresiju, očekuje se manja toksičnost, ali i manja efikasnost terapije. Pokazano je da deca obolela od ALL sa *TYMS* 3R3R genotipom imaju povećan rizik od recidiva bolesti (88), dok pacijenti sa RA i *TYMS* 3R3R genotipom

pokazuju slabiji odgovor na terapiju MTX (87). Kod adultnih pacijenata sa ALL, koji su nosioci *TYMS* 3R3R genotipa, registrovana je anemija tokom primene MTX (72).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- (I) Utvrđivanje uestalosti genetičkih varijanti c.677 i c.1289 u genu za *MTHFR*, -680, -675, -556, -454 i -317 u genu za *DFHR*, c.80 u genu za *SLC19A1* i 6 bp delecije i 28 bp tandemskog ponovka u genu za *TYMS* u dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom i kontrolnoj grupi
- (II) Ispitivanje korelacije prisutnih varijanti u genima za *DFHR*, *MTHFR*, *SLC19A1* i *TYMS* sa parametrima prognoze i faktorima od značaja za stratifikaciju rizika kod dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom
- (III) Praćenje farmakokinetike, kliničke i laboratorijske toksikosti tokom primene metotreksata i korelacija dobijenih podataka sa varijantama u genima za *DFHR*, *MTHFR*, *SLC19A1* i *TYMS*
- (IV) Ispitivanje uticaja detektovanih varijanti u genima za *DFHR*, *MTHFR*, *SLC19A1* i *TYMS* na ishod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije

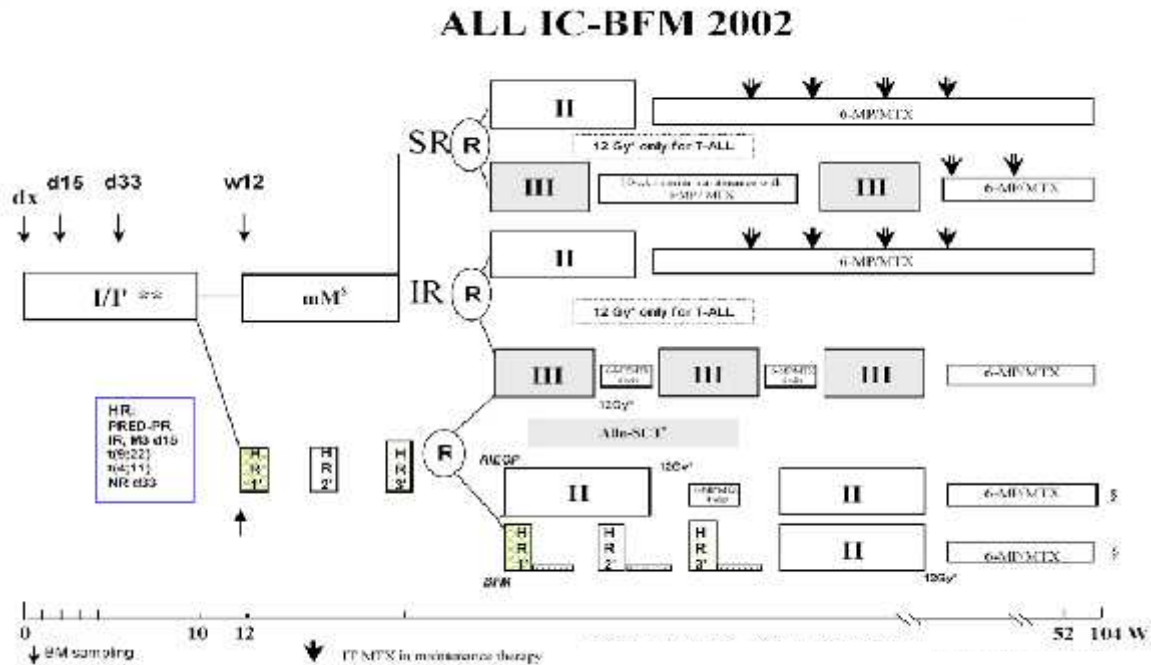
3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

Studija je obuhvatila 161 dete obolelo od ALL, pronađeno u periodu od 1.12.2002. do 1.11.2012. godine. Na Univerzitetskoj dejoj klinici (UDK) u Beogradu je dijagnostikovano i leđeno 140 dece, dok je u 21 bolesnika dijagnoza postavljena na UDK, a potom su leđena u svom regionalnom zdravstvenom centru na Dejoj klinici Klinički ko- bolni kog centra Banja Luka (DK KBC).

Dijagnoza je postavljena na osnovu standardnih citomorfoloških, citohemijskih, imunofenotipskih i genetičkih kriterijuma.

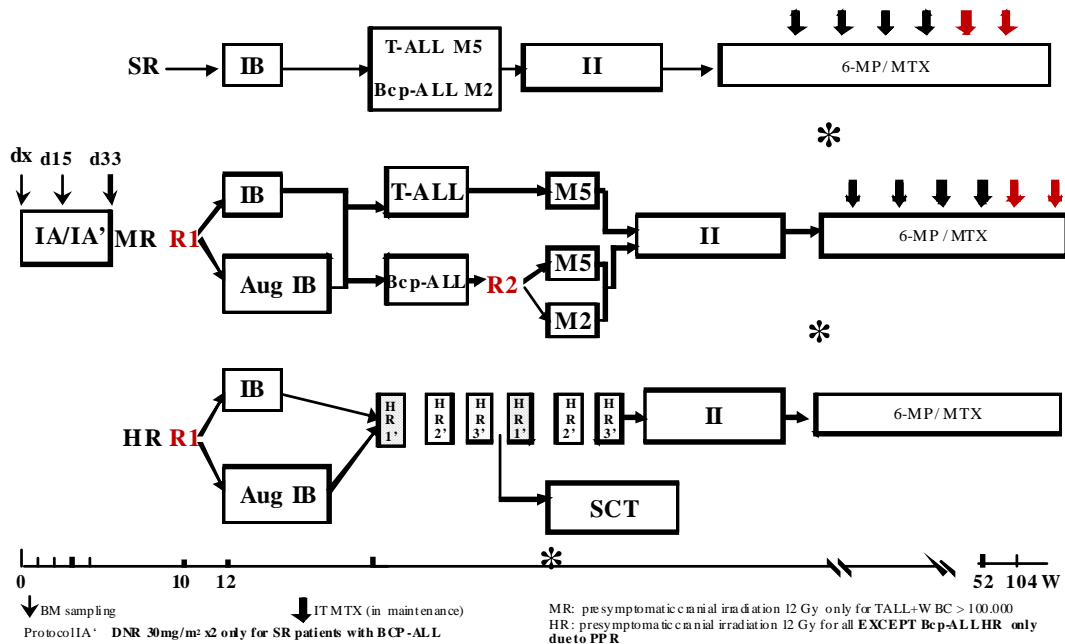
Terapija je sprovedena po aktuelnim ALL IC-BFM 2002 (engl. *Acute Lymphoblastic Leukemia International Committee Berlin Frankfurt Munster*) i ALL-IC BFM 2009 protokolima (Slike 3 i 4), koji se sastoje iz uobičajenih faza leđenja: indukcije, konsolidacije, reindukcije i faze održavanja.



Slika 3. Šematski prikaz ALL IC-BFM 2002 protokola

ALL IC-BFM 2009 : TREATMENT

Version approved after Glasgow on October 2008



Slika 4. Šematski prikaz ALL IC-BFM 2009 protokola

Stratifikacija rizika podrazumevala je podelu ispitanika u tri grupe: niski (engl. *Standard risk* – SR), srednji (engl. *Intermediate risk* – IR) i visoki (engl. *High risk* – HR), na osnovu uzrasta na dijagnozi, inicijalnog broja leukocita, citogenetskih i molekularno-genetskih rearanžmana i procene odgovora na terapiju 8, 15. i 33. dana terapije.

3.2. Terapija metotreksatom, pra enje farmakokinetike i toksi nosti

U oba primenjena terapijska protokola MTX je ordiniran u fazi konsolidacije i u fazi održavanja. U fazi konsolidacije se primenjuje parenteralno, u odnosu na inicijalni imunofenotip i granu randomizacije, u dozi od 2 g/m^2 (protokol mM) i 5 g/m^2 (protokol M i HR blokovi), u etiri navrata, u vremenskom razmaku od dve nedelje. U fazi održavanja se ordinira peroralno, u dozi od 20 mg/m^2 jednom nedeljno, tokom 15-18 meseci, zavisno od grupe rizika.

Farmakokinetika MTX je pra ena standardnim biohemijskim metodama za odre ivanje nivoa leka u krvi, 24h i 48h sata od zapo injanja primene, a u slu aju produženih nivoa i u dodatnim vremenskim intervalima. U slu aju produžene PKMTX, ordinirane su dodatne doze hemioprotektanta u vidu redukovane folne kiseline (leukovorin – LCV) u skladu sa terapijskim protokolom.

Pra enje klini ke i laboratorijske toksi nosti je sprovedeno prema kriterijumima Nacionalnog instituta za rak (engl. *Common Toxicity Criteria – CTC, National Cancer Institute – NCI*). Klini ka toksi nosti je podrazumevala pojavu infekcije, oralnog mukozitisa (OM), kožnih promena (crvenilo oko o iju, na pregibima i u perianalnom predelu), gastroenteroloških (GIT – povra anje ili dijareja) i neuroloških poreme aja (koji su dokazani neuro-radiološkim ili elektroneuromiši nim ispitivanjima). Laboratorijska toksi nosti je evaluirana kroz biohemijske parametre za ispitivanje funkcije jetre (bilirubin i transaminaze) i bubrega (urea, kreatinin i proteinurija). Toksi nost je prema CTC-NCI kriterijumima gradirana od 0 (stanje bez promena) do 4 (najintenzivniji neželjeni efekti).

3.3. Biološki materijal

Materijal za PCR analizu etiri gena (*MTHFR, TYMS, SLC19A1 i DHFR*) uzet je standardnom aspiracijom koštane srži u momentu dijagnoze obolelim pacijentima i iz periferne venske krvi zdravim osobama koje su inile kontrolnu grupu.

U retkim slu ajevima, kada nije bilo dovoljno biološkog materijala za geneti ku analizu, retrogradno su koriš ene nebojene plo ice razmaza kostne srži.

Aspirat kostne srži je transportovan u epruveti sa antokoagulansom (Na-citrat) do Laboratorije za molekularnu biomedicinu Instituta za molekularnu genetiku i genetski inžinjeri ng, gde je vršena izolacija DNK za gene *MTHFR, TYMS, SLC19A1 i DHFR*.

3.3.1. Metode za izolaciju DNK

3.3.1.2. Izolacija DNK na koloni iz krvi ili koštane srži

DNK je izolovana pomoću *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany, u daljem tekstu *Qiagen*) prema uputstvu proizvođača. U tubu od 1.5 ml se sipa 20 µl *Qiagen* proteaze K. Doda se 200 µl pune venske krvi ili koštane srži i 200 µl AL pufera. Nakon mešanja na vorteksu, inkubira se 56°C, 10 min. Uzorak se kratko centrifugira da bi se uklonile kapljice sa unutrašnje strane poklopca tube. Doda se 200 µl 100% etanola, promeša se na vorteksu i kratko centrifugira. Uzorak se prenese na kolonu i centrifugira 1 min/8,000 rpm da bi se DNK vezala za kolonu. Eluat se odbaci. Zatim se doda 500 µl AW1 pufera i kolona se centrifugira 1 min/8,000 rpm, a eluat se odbaci. Ispiranje DNK se ponavlja sa 500 µl AW2 pufera, centrifugira se 3 min/13,000 rpm i eluat se odbaci. Zatim se kolona prenese u 1.5 ml tubu, doda se 200 µl destilovane vode ili AE pufera, i inkubira 5 min na sobnoj temperaturi. Centrifugiranjem 1 min/8,000 rpm DNK se eluira u 1.5 ml tubu. Uzorak se čuva na -20°C.

3.3.1.3. Izolacija DNK na koloni sa razmaza krvi ili koštane srži

DNK je izolovana pomoću *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (*Qiagen*) prema modifikovanom uputstvu proizvođača za izolaciju DNK sa osušenih krvnih mrlja. Razmaz krvi ili koštane srži je potrebno ukloniti sa staklene pločice i preneti u tubu. To se postiže pomoću par i papirne vate natopljenih destilovanom vodom kojima se pločica ogrebe. Par i papirne vate sa uzorkom se prenese u 1.5 ml tubu. Vata sa uzorkom se osuši i u tubu se doda se 180 µl ATL pufera. Tuba se inkubira 10 min na 85°C. Zatim se doda 20 µl proteaze K, promeša vorteksovanjem i inkubira 1h na 56°C. Nakon kratkog centrifugiranja, doda se 200 µl AL pufera, temeljno promeša na vorteksu i inkubira 10 min na 70°C. Uzorak se kratko centrifugira da bi se uklonile kapljice sa unutrašnje strane poklopca tube. Doda se 200 µl 100% etanola, promeša se na vorteksu i kratko centrifugira. Uzorak se prenese na kolonu i centrifugira 1 min/8,000 rpm da bi se DNK vezala za kolonu. Eluat se odbaci. Zatim se doda 500 µl AW1 pufera i kolona se

centrifugira 1 min/8,000 rpm, a eluat se odbaci. Ispiranje DNK se ponavlja sa 500 µl AW2 pufera, centrifugira se 3 min/13,000 rpm i eluat se odbaci. Zatim se kolona prenese u 1.5 ml tubu, doda se 200 µl destilovane vode ili AE pufera, i inkubira 5 min na sobnoj temperaturi. Centrifugiranjem 1 min/8,000 rpm se DNK eluira u 1.5 ml tubu. Uzorak se uva na -20°C.

3.3.2. Metode za određivanje genetičkih varijanti

3.3.2.1. Analiza DNK fragmenata elektroforezom na agaroznom gelu

Analiza DNK vrši se elektroforetskim razdvajanjem na horizontalnom agaroznom gelu. Kraći DNK fragmenti putuju brže kroz gel u električnom polju, što omogućava razdvajanje fragmenata po veličini. Koncentracija gela, koja se obično kreće između 1% – 4% i zavisi od potrebne rezolucije i očekivane dužine DNK fragmenata. Za pripremanje gelova i za elektroforezu koristi se 1xTAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA pH=8.0). U gel se dodaje fluorescentna boja etidijum bromid (u finalnoj koncentraciji 0.575-0.75 µg/ml) koja se interkalira u DNK i omogućava njenu vizuelizaciju pod UV svetlom. Elektroforeza se izvodi pri jačini struje od 100 mA i naponu od 100 V. Velicina fragmenata DNK, kao i procena prinosa reakcije se određuje poređenjem sa komercijalnim markerom – DNK lestvicom.

3.3.2.2. Analiza DNK fragmenata elektroforezom na poliakrilamidnom gelu

Ukoliko je potrebna veća rezolucija razdvajanja DNK fragmenata, umesto agarozne, koristi se vremenski zahtevnija poliakrilamidna (PAA) gel elektroforeza. Analiza PCR fragmenata vršena je na vertikalnom 12% poliakrilamidnom gelu. Poliakrilamid se sastoji od niti nastalih polimerizacijom akrilamidnih subjedinića, povezanih N,N'-metilenbisakrilamidom. Za pripremanje gela koristi se 12% rastvor akrilamida i N,N'-metilenbisakrilamida u odnosu 29:1. Za elektroforezu i za pripremanje gela korišćen je 1xTBE pufer (100 mM Tris, 83 mM borna kiselina, 1 mM EDTA pH=8.0). Kao inicijatori polimerizacije koriste se 0.1% amonijumpersulfat i 0.01%

TEMED. Elektroforeza se izvodi pri ja ini struje od 60 mA i naponu od 300 V u toku 3.5h.

Vizuelizacija DNK fragmenata na PAA gelovima vršena je bojenjem srebronitratom (89). Poliakrilamidni gel je potapan u rastvor 10% etanola i 0.5% sir etne kiseline. Nakon toga, gel je bojen 0.1% rastvorom AgNO_3 10 min, uz neprekidno mešanje. Višak AgNO_3 je uklanjan ispiranjem najpre u destilovanoj vodi, dva puta, a zatim u razvija u slede eg sastava: 1.5% NaOH, 0.01% NaBH_4 i 0.048% formaldehid. Gelovi su u razvija u držani 15-20 min, do pojave traka. Razvijanje je stopirano potapanjem gelova u 0.75% rastvor Na_2CO_3 .

3.3.2.3. Odre ivanje geneti kih varijanti PCR metodom

Odre ivanje broja tandemskih ponovaka i indelova elektrofororezom nakon PCR reakcije se bazira na razlici u dužini PCR fragmenata kod razli itih alela. Ovom metodom su odre ivane varijante u genu *TYMS* – broj ponovaka od 28bp u 5'UTR-u i indel od 6bp u 3' UTR-u.

Deo 5'UTR gena *TYMS* je amplifikovan koriste i uzvodni prajmer 5'-GTGGCTCCTGCGTTTCCCC-3' i nizvodni prajmer 5'-TCCGAGCCGGCCACAGGCAT -3'. PCR reakcija finalnog volumena 20 μl je sadržala: 1 x Q rastvor (*Qiagen*), 1 x pufer (*Qiagen*), 1.5 mM MgCl_2 , 0.4 mM dNTP, 0.8 mM svakog od prajmera, 0.5 U polimeraze (*KAPA Biosystems*). Temperaturni profil PCR reakcije je bio slede i: 5 min/95°C, 35 x (30 s/95°C, 30 s/66°C, 30 s/72°C), 7 min/72°C. Broj ponovaka od 28bp je detektovan na osnovu dužine traka nakon 3% agarozne elektroforeze. O ekivane dužine PCR produkata od 212, 240 i 268bp odgovaraju alelima sa 2, 3, odnosno 4 tandemski ponovka.

Deo 3'UTR-a gena *TYMS* je amplifikovan koriste i uzvodni prajmer 5'-CAAATCTGAGGGAGCTGAGT -3' i nizvodni prajmer 5'-CAGATAAGTGGCAGTACAGA -3'. PCR reakcija finalnog volumena 25 μl je sadržala: 1 x Q rastvor (*Qiagen*), 1 x pufer (*Qiagen*), 1.5 mM MgCl_2 , 0.4 mM dNTP, 0.4 mM svakog od prajmera, 0.75 U polimeraze (*KAPA Biosystems*). Temperaturni profil PCR reakcije je bio slede i: 5 min/95°C, 35 x (30 s/95°C, 30 s/61°C, 20 s/72°C), 7

min/72°C. Indel od 6bp je detektovan na osnovu dužine PCR fragmenata nakon PAA elektroforeze. Otkrivana dužina PCR produkata od 148bp odgovaraju deleciji (6bp-), dok dužina od 154bp odgovara inserciji (6bp+) (90).

3.3.2.4. Detekcija genetičkih varijanti PCR-RFLP metodom

PCR-RFLP metoda je korišćena za određivanje varijante tipa SNV. Najpre se umnoži region u kome se nalazi ta kasta varijanta, a zatim se PCR fragmenti podvrgnu restrikcijom digestijom odgovarajućom endonukleazom. Endonukleaza se bira tako da PCR fragment se može ukoliko je prisutna određena genetička varijanta, a da ne može ukoliko nije. Ovom metodom je određena genetička varijanta *MTHFR* c.677 C>T. DNK region koji obuhvata ovu varijantu nukleotidnog mesta (SNV) je amplifikovan koristeći uzvodni prajmer 5'- TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' i nizvodni prajmer 5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'. PCR reakcija finalnog volumena 20 µl je sadržala: 1 x pufer (*KAPA Biosystems*), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.4 mM prajmeri, 1 U polimeraze (*KAPA Biosystems*). Temperaturni profil PCR reakcije je bio sledeći: 5 min/95°C, 35 x (30 s/95°C, 30 s/62°C, 20 s/72°C), 7 min/72°C. Izmeću 150 i 200 ng PCR fragmenata sa 3 U *HinfI* (*Thermoscientific, Waltham, MA, USA*) restrikcijom enzimom i odgovarajućim puferom za digestiju dodati su u restrikcijonu smešu finalnog volumena od 15 µl. Nakon 3% agarozne elektroforeze, nukleotidu C odgovara dužina od 198bp, dok nukleotidu T odgovara dužina od 175 + 24bp na gelu (53).

3.3.2.5. Detekcija genetičkih varijanti alel-specifičnim PCR-om

Alel-specifični PCR (AS-PCR) se koristi za detekciju baznih zamena ili malih delecija. Kod alel-specifičnog PCR-a određeni region se umnožava samo ako je prisutna DNK pacijenta koji nosi određeni alel. Jedan od prajmera (uzvodni ili nizvodni prajmer) je dizajniran je tako da svojim 3' krajem obuhvata varijabilno mesto od interesa i specifičan je za svaki od alela. Za svakog ispitanika su pripremljene 2 reakcije smeše za PCR, u kojima se nalazi po jedan alel-specifični prajmer. Obe reakcije smeše sadrže „zajednički“ prajmer, kao i par prajmera kojima se umnožava „kontrolni“ PCR fragment,

koji služi kao pozitivna kontrola PCR reakcije. Nakon AS-PCR reakcije prisustvo ili odsustvo PCR produkta govori da li ispitanik nosi ili ne nosi određeni alel. AS-PCR-om su detektovane *MTHFR* c.1298 A>C i *SLC19A1* c.80 G>A genetičke varijante.

Za detekciju *MTHFR* c.1298 A>C varijante, korišteni su alal-specifični uzvodni prajmeri 5'-GGAGCTGACCAGTGAAGC-3' i 5'-GGAGCTGACCAGTGAAGA-3' i nizvodni prajmer 5'-CTGGGGCGACCATCAG-3', dok je za detekciju *SLC19A1* c.80 G>A varijante korišćen uzvodni prajmer 5'-TGGCTCCCAGTTTGGTGCTA-3' i alal-specifični nizvodni prajmeri 5'-CAAAGGTAGCACACGAGGC-3' i 5'-CAAAGGTAGCACACGAGGT-3'. U svaku PCR reakciju AS-PCR dodavan je i par „kontrolnih“ prajmera kojima je umnožavan PCR produkt korišćen kao pozitivna kontrola PCR reakcije. Za umnožavanje kontrolnog PCR produkta u oba slučaja korišteni su prajmeri 5'-TGCCAAGTGGAGCACCCAA-3' i 5'-GCATCTTGCTCTGTGCAGAT-3'.

PCR smeša za detekciju *MTHFR* c.1298 A>C varijante, zapremine 25 µl je bila sledećeg sastava: 80 ng DNK, 0.5 x Q rastvor (*Qiagen*), 1 x pufer (*KAPA Biosystem*), 0.4 M dNTP-a, 1 U KAPA Taq polimeraze, po 1.2 µM alel-specifičnog i zajedničkog prajmera i po 0.4 µM kontrolnih prajmera. Korišćen je „touch down“ temperaturni profil: 1 min/96°C, 5 x (20 s/96°C, 45 s/70°C, 25 s/72°C), 21 x (25 s/96°C, 50 s/65°C, 30 s/72°C), 4 x (30 s/96°C, 60 s/55°C, 90 s/72°C), 2 min/20°C.

PCR smeša za detekciju *SLC19A1* c.80 G>A varijante, zapremine 25 µl je bila sledećeg sastava: 80 ng DNK, 0.5 x Q rastvor (*Qiagen*), 1 x pufer (*KAPA Biosystem*), 0.4 M dNTP-a, 1 U KAPA Taq polimeraze, po 0.4 µM alel-specifičnog i zajedničkog prajmera i po 0.4 µM kontrolnih prajmera. Temperaturni profil PCR reakcije je bio sledeći: 1 min/96°C, 5 x (20 s/96°C, 45 s/70°C, 30 s/72°C), 21 x (25 s/96°C, 50 s/65°C, 40 s/72°C), 4 x (30 s/96°C, 60 s/60°C, 90 s/72°C), 2 min/20°C (91).

3.3.2.6. Određivanje genetičkih varijacija sekvenciranjem PCR produkata

Sekvenciranjem amplifikovanih fragmenata mogu da se detektuju sve genetičke varijante u određenom regionu. Ova metoda se bazira na upotrebi modifikovanih, dideoksi nukleotidtrifosfata (ddNTP) koji po ugrađivanju u DNK lanac zaustavljaju PCR

reakciju. Svaki od četiri ddNTP je obeležen posebnom fluorescentnom bojom, što omogućava da se reakcija sekvenciranja uradi u jednoj tubi. Specifičnost PCR-a za sekvenciranje je u tome što pored obeleženih ddNTP-ova, sadrži samo jedan prajmer i što se kao matrica koristi ranije umnoženi DNK fragment. Po završetku PCR reakcije za sekvenciranje, dobijaju se fragmenti različitih dužina obeleženi različitim fluorescentnim bojama koji odgovaraju poziciji i tipu nukleotida na 3' kraju fragmenta. Nakon razdvajanja obeleženih PCR fragmenata elektroforezom visoke rezolucije i njihove vizualizacije, DNK sekvenca se direktno očitava.

Ova metoda je korišćena i za detekciju varijanti u promotoru gena *DHFR*. Deo promotora gena *DHFR* je amplifikovan koristeći uzvodni 5'-CGAAAGGAACAAGATTTTGAAGCACCC-3' i nizvodni prajmer, 5'-TCCTGACTCCCATTTCTGATGAGGG-3'. PCR reakcija finalnog volumena 10 µl je sadržala: 1 x Q rastvor (*Qiagen*), 1 x pufer (*Qiagen*), 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.32 mM prajmeri, 0.4 U polimeraze (*Qiagen*). Korišćen je „touch down” temperaturni profil PCR reakcije: 15 min/94°C, 20 x (30 s/94°C, 30 s/60°C (u svakom sledećem ciklusu se temperatura anilinga smanjuje za po 0.5°C), 60 s/72), 20 x (30 s/94°C, 30 s/50°C, 60 s/72°C), 7 min/72°C.

PCR za sekvenciranje je rađen u finalnom volumenu od 5 µl i sadržao je: oko 10 ng PCR produkta, 2 pmola uzvodnog prajmera, 0.5 µl miksa za sekvenciranje (*BigDye™ Terminator v.3.1 Ready Reaction Kit Applied Biosystems*). Temperaturni profil PCR reakcije za sekvenciranje je bio sledeći: 25 x (10 s/96°C, 5 s/50°C, 4 min/60°C).

Produkti PCR-a za sekvenciranje se prečišćavaju dodavanjem 40 µl rastvora (37.5 mM Na-acetat, 78% etanol). Smeša se promućkava na vorteksu i centrifugira 20 min/13,000 rpm. Supernatant se odbaci, a ispiranje se ponovi pomoću 200 µl 70% etanola. Talog se potpuno osuši i rastvori u 25 µl Hi-Di formamida. Celokupni volumen se nanese u bunarike na mikrotitarskoj ploči i analizira pomoću 3130 *Genetic Analyzer-a (Applied Biosystems)*.

3.4. Statisti ka obrada podataka

Dobijeni podaci u studiji su obrađeni i prikazani na tabelama i grafikonima uz prpratnu diskusiju istih, a u zavisnosti od prirode posmatrane varijable.

Deskripcija numeričkih obeležja je urađena klasičnim metodama opisne statistike i to aritmetičkom sredinom i medijanom od srednjih vrednosti i od mera varijabiliteta standardnom devijacijom kao i minimalnom i maksimalnom vrednošću. Relativni brojevi su korišćeni u svim tabelama.

Analiza raspodela posmatranih varijabli urađena je testom slaganja po Kolmogorov - Smirnovu u cilju primene parametarskih analitičkih metoda.

U analizi rezultata, u zavisnosti od prirode samih varijabli, korišćeni su Studentov t test kod parametarskih podataka i Mann - Whitneyev test sume rangova za poređenje razlike između dve grupe neparametarskih podataka po jednom obeležju.

U situacijama kada je bilo više od dva obeležja, primenjena je ili parametarska ili neparametarska analiza varijansnog kolidika (ANOVA).

Za analizu dva atributivna obeležja korišćen je Pearsonov Hi kvadrat test u obliku tablica kontingencije, a za analizu tri i više obeležja Fisherovu analizu varijanse za proporcije.

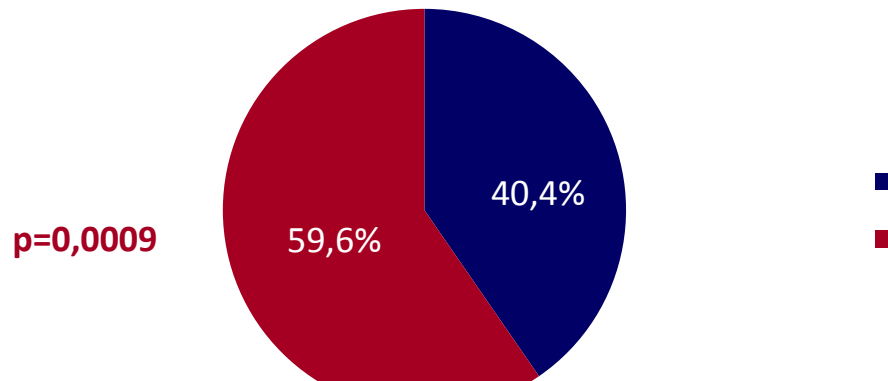
Za identifikaciju prediktora ishoda i preživljavanja primenjena je Kaplan majerova metoda i Log rank test.

1. REZULTATI

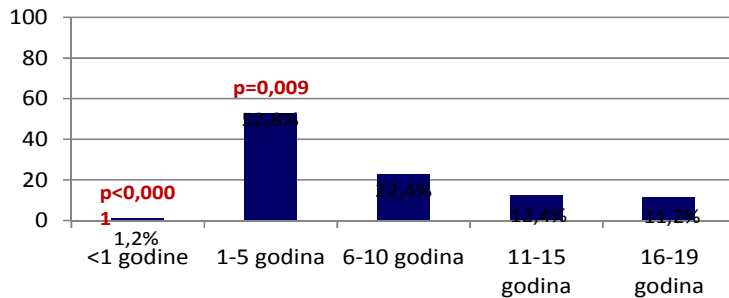
Ispitano je 161 dete sa ALL, ukupne dužine pra enja od 3,7 do 13,5 godina, sa medijanom od 6,8 godina.

4.1. Klini ki i laboratorijski parametri na prezentaciji bolesti

U našoj grupi ispitanika muški pol je statisti ki zna ajno zastupljeniji (96/161) u odnosu na ženski (65/161). Uzrast se kretao od 0,7 do 17,5 godina, medijane 5,4 godina. Najve i broj dece je dijagnostikovao izme u prve i šeste godine ($p=0,009$), a najmanji broj u odojaka kom uzrastu ($p<0,0001$). Distribucija ispitanika u odnosu na pol i uzrast su prikazane na Grafikonu 1 i Grafikonu 2.

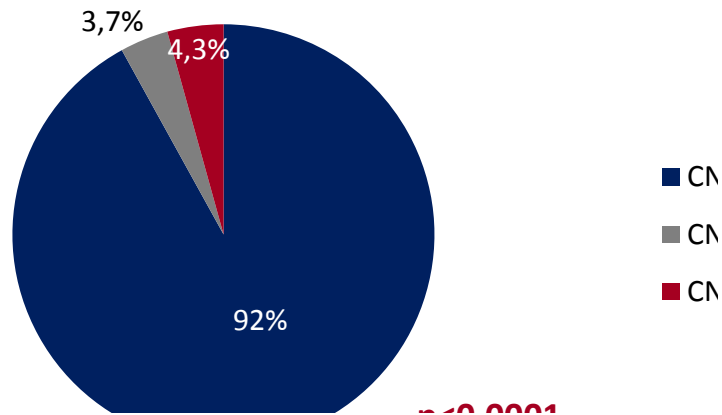


Grafikon 1. Distribucija ispitanika u odnosu na pol



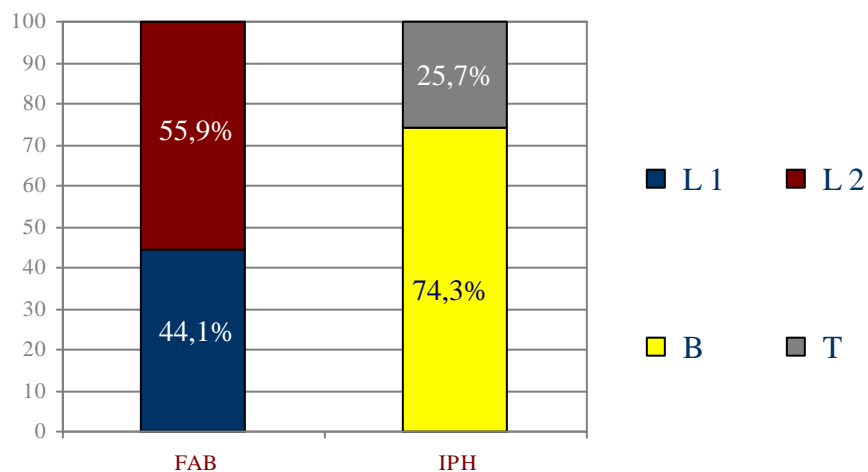
Grafikon 2. Distribucija ispitanika u odnosu na uzrast

CNS status 1 (odsustvo blasta u likvoru i kliničkih znakova CNS bolesti) je imalo 148 dece (92%), CNS status 2 (traumatska lumbalna punkcija sa 5 elija/ μ L u cerebrospinalnoj tečnosti) je detektovan u 6 dece (3,7%), dok je CNS status 3 (klinički znaci CNS infiltracije i > 5 elija/ μ L u likvoru sa predominacijom blasta na citospinu) viđen u 7 dece (4,3%) (Grafikon 3).



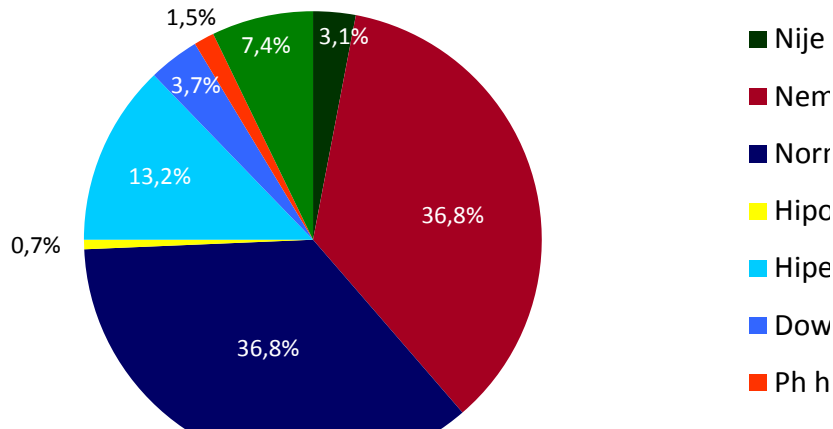
Grafikon 3. Distribucija ispitanika u odnosu na inicijalni CNS status

Klasifikacija po FAB-u je pokazala da je L1 podtip ispoljilo 71 dete (44,1%), dok je morfološke odlike L2 podtipa notirane u 90 dece (55,9%). Imunofenotip koji odgovara B elijskoj liniji je viđen u 134 dece (74,3%), u odnosu na 27 dece (25,7%) sa ekspresijom antigena specifičnih za T elijsku liniju (Grafikon 4).



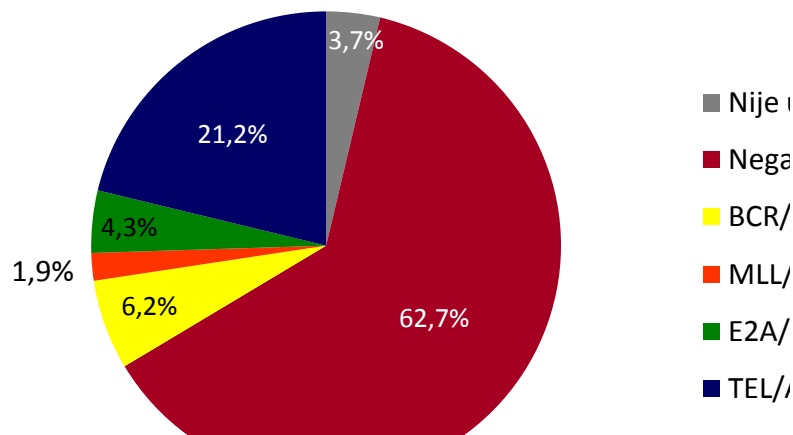
Grafikon 4. Distribucija citomorfoloških i imunofenotipskih podtipova

Konvencionalnim citogenetskim analizama, normalan kariotip je detektovan u 36,8% (50/161), hiperdiploidija u 13,2% (18/161), hipodiploidija u 0,7% (1/161), t(9;22) u 1,5% (2/161), +21 u 3,7% (5/161) i kompleksan kariotip (3 složene aberacije) u 7,4% (10/161). U 36,8% dece nisu vi ene mitoze (50/161) (Grafikon 5).



Grafikon 5. Distribucija ispitanika u odnosu na kariotip

Molekularno-genetske analize su pokazale da u 62,7% (101/161) dece nisu detektovani fuzioni transkripti od zna aja za stratifikaciju rizika i primenu usmerene terapije, dok u 3,7% (6/161) ispitanika analiza nije uspjela iz tehni kih razloga. Najve i broj dece je bio pozitivan na TEL/AML1 u 21,2% (34/161), BCR/ABL u 6,2% (10/161), E2A/PBX1 4,3% (7/161) i MLL/AF4 u 1,9% (3/161) (Grafikon 6).

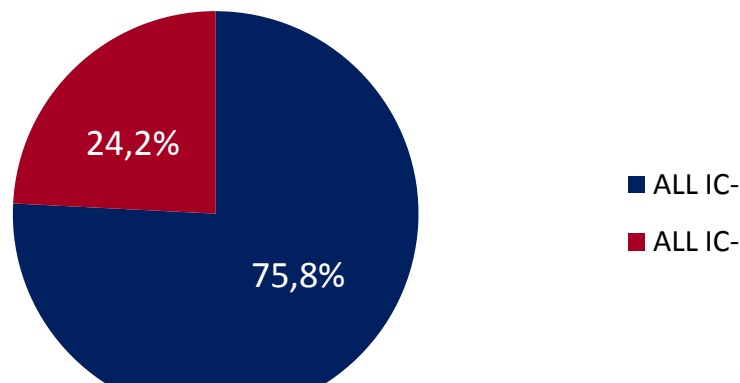


Grafikon 6. Distribucija ispitanika u odnosu na molekularno genetske aberacije

4.2. Stratifikacija rizika prema standardnim i molekularno-genetskim parametrima prognoze

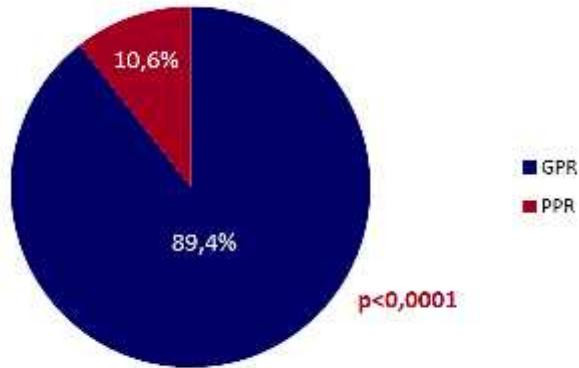
Protokol ALL IC-BFM 2002, po kome je le en najve i broj naših ispitanika, nalaže stratifikaciju rizika u odnosu na uzrast, inicijalni broj leukocita, pozitivan citogenetski nalaz na t(9;22) i t(4;11) ili molekularno-genetski na BCR/ABL i MLL/AF4, odgovor na kortiko-steroidne 8. dana terapije i procenat blasti u kostnoj srži 15. i 33. dana terapije. Stratifikacija u odnosu na uzrast podrazumeva da se deca uzrastne dobi od 1-6 godina i sa inicijalnim brojem Le < 20000/mm³ svrstavaju u standardnu grupu rizika, ukoliko ne postoje drugi ko-faktori rizika. Apsolutan broj neutrofila (ABN) 1000 8. dana terapije se smatra lošim odgovorom na inicijanu kortikosteroidnu terapiju i direktno svrstava decu u grupu visokog rizika. M1 označava prisustvo do 5% leukoblasta, M2 predstavlja 5-25% blasta, a M3 25% leukoblasta u kostnoj srži 15. odnosno 33. dana terapije, što ukazuje na odsustvo kompletne remisije (engl. *Complete remission* – CR).

U odnosu na ALL IC-BFM 2002, ALL IC-BFM 2009 protokol, po kome se le io manji broj dece, uklju uje više parametara u stratifikaciju rizika. Pored navedenih, koji su zajedni ki, u grupu visokog rizika direktno svrstava prisustvo hipodiploidije u kariotipu. Nalaz MRD 15. dana terapije je determinisan tako da < 0.1% odgovara grupi niskog, 0.1-10% srednjeg i > 10% visokog rizika. Distribucija dece u odnosu na primenjene protokole le enja je prikazana na Grafikonu 7.

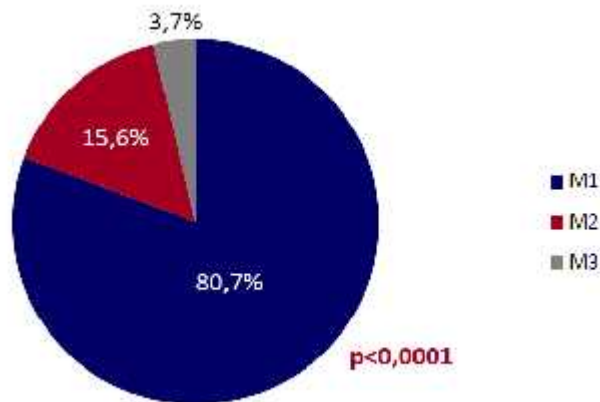


Grafikon 7. Distribucija ispitanika u odnosu na primenjeni protokol le enja

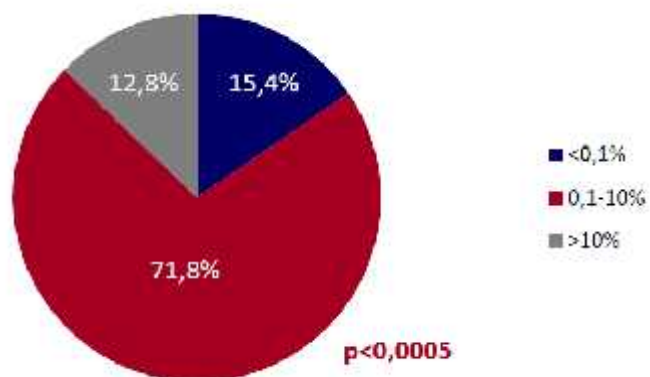
Distribucija uzrasta je već predstavljena na Grafikonu 2, a u nastavku teksta je grafički prikazana zastupljenost dece u odnosu na procenu odgovora na terapiju: apsolutni broj blasta (ABB) 8. dana (Grafikon 8), mijelogram 15. dana (Grafikon 9), MRD 15. dana (Grafikon 10) i mijelogram 33. dana (Grafikon 11).



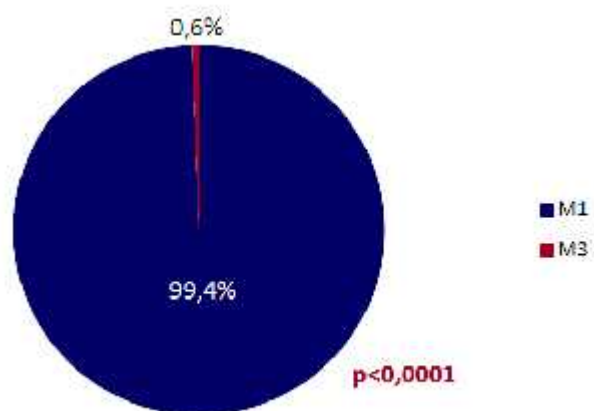
Grafikon 8. Distribucija ispitanika u odnosu na odgovor na terapiju 8. dana lečenja (GPR – engl. *Good Prednisolon responder*, PPR – engl. *Poor Prednisolon responder*)



Grafikon 9. Distribucija ispitanika u odnosu na mijelogram 15. dana lečenja

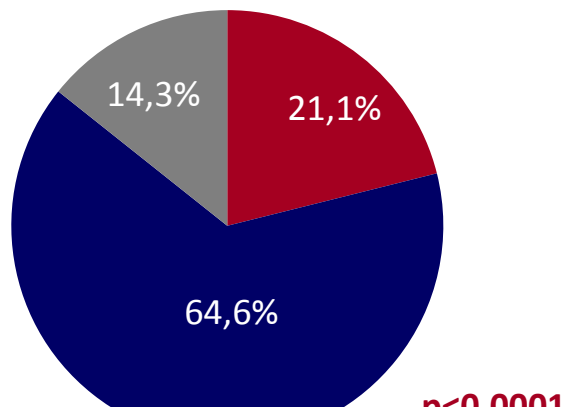


Grafikon 10. Distribucija ispitanika u odnosu na MRD 15. dana le enja



Grafikon 11. Distribucija ispitanika u odnosu na mijelogram 33. dana le enja

Prema navedenim parametrima za stratifikaciju rizika, koja ukljuuje oba primenjena protokola, u SR je svrstano 21,1% (34/161), u IR 64,6% (104/161), a u HR 14,3% (23/161) (Grafikon 12).



Grafikon 12. Distribucija dece u odnosu na grupe rizika

4.3. Poređenje pacijenata i kontrolne grupe u uestalosti polimorfizama u ispitivanim genima

Uestalost varijanti u ispitivanim genima u dece obolele od ALL i u kontrolnoj grupi, kao i međusobna korelacija predstavljena je u Tabeli 1.

Tabela 1. U estalost ispitivanih polimorfizama u pacijenata i kontrolnoj grupi

Polimorfizmi		Pacijenti		Kontrolna grupa		Statisti ka zna ajnost (p)
		Uzorak (broj)	U estalost (%)	Uzorak (broj)	U estalost	
TYMS	6 bp					
	I/I	148	47,3	104	45,2	0,7414
	I/D		41,2		43,3	0,7414
	D/D		11,5		11,5	0,9920
	28 bp					
	3/3	149	33,6	104	33,7	0,9840
	3/2		41,6		49,1	0,2420
	2/2		24,8		17,3	0,1527
MTHFR	677					
	C/C	149	47	104	51	0,5352
	C/T		41,6		33,6	0,2005
	T/T		11,4		15,4	0,3575
	1298					
	A/A	146	48,6	104	57,7	0,1585
	A/C		39,1		32,7	0,3030
C/C	12,3		9,6		0,5028	
SLC19A1	80					
	G/G	146	27,4	104	25,9	0,8025
	G/A		45,9		52,9	0,2757
	A/A		26,7		21,2	0,3125
DHFR	680					
	A/A	142	10,6	104	12,5	0,6383
	C/A		45		44,2	0,8965
	C/C		44,4		43,3	0,8650
	675					
	A/A	142	52,8	104	52,9	0,9920
	A/G		38		42,3	0,4965
	G/G		9,2		4,8	0,1970
	556					
	T/T	142	52,1	104	52,9	0,9044
	T/C		38,7		41,3	0,6818
	C/C		9,2		5,8	0,3270
	464					
	A/A	142	51,4	104	52,9	0,8181
	A/T		39,4		41,3	0,7641
T/T	9,2		5,8		0,3279	
317						
A/A	142	34,5	104	35,6	0,8650	
A/G		50		48,1	0,7641	
G/G		15,5		16,3	0,8571	

Nije vi ena razlika u incidenci geneti kih varijanti izme u dece obolele od ALL i kontrolne grupe, koja je brojala 104 zdrava ispitanika. Detekcija polimorfizama nije uspela iz tehni kih razloga u svih ispitanika u studiji, tako da je analiza za varijantu c.677 u genu *MTHFR* u injena u 149, *MTHFR* c.1298 u 146, *DHFR* -680 C>A, -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T i -317 A>G u 142, *SLC19A1* c.80 u 146, 6bp *TYMS* u 148 i 28bp *TYMS* u 149 dece.

4.4. Korelacija varijanti u ispitivanim genima sa standardnim i molekularno-genetskim parametrima prognoze

Istražena je prevalenca u odnosu na pol, gde nije vi eno statisti ki zna ajno odstupanje, što je predstavljeno u Tabeli 2. Me utim, kada se ispita prose an uzrast bolesnika na dijagnozi, uvi a se da su deca sa 6bp D/D varijantom u genu za *TYMS* zna ajno starija, sa statisti kom validnoš u od $p=0,045$, što je pokazano na Tabeli 3.

Korelacija u odnosu na IPH je pokazala statisti ki zna ajna odstupanja u distribuciji geneti kih varijanti. Izrazitu asocijaciju sa B- elijskim IPH, koji spada u povoljan prognosti ki parametar su ispoljile varijante -675 A>G ($p=0,014$), -556 T>C ($p=0,018$), -464 A>T ($p=0,022$) u genu za *DHFR*, dok je *MTHFR* c.1298 C>C statisti ki zna ajnije zastupljen kod manje povoljnog T- elijskog IPH ($p=0,019$), što je sumarno prikazano u Tabeli 4.

Distribucija varijanti u ispitivanim genima nije pokazala statisti ki zna ajnu distribuciju u odnosu na infiltraciju CNS-a (Tabela 5).

U odnosu na kariotip koštane srži ispitanika, pokazana je snažna korelacija izme u prisustva varijante 6bp u genu za *TYMS* i kompleksnog kariotipa ($p=0,022$), što podrazumeva da je ovaj polimorfizam zna ajno eš e zastupljen u dece koja imaju više od tri složene genetske aberacije (Tabela 6).

Pore enje varijanti u ispitivanim genima sa molekularno-genetskim rearanžmanima na dijagnozi nije ukazala na statisti ki zna ajnu povezanost (Tabela 7).

Tabela 2. Distribucija polimorfizama u ispitivanim genima u odnosu na pol

Polimorfizmi		Pol		Statistička značajnost (p)
		Ženski	Muški	
TYMS	6 bp			0,82
	I/I	24/70 (34,3%)	46/70 (65,7%)	
	I/D	30/61 (49,2%)	31/61 (50,8%)	
	D/D	4/17 (23,5%)	13/17 (76,5%)	
	28 bp			0,805
	3/3	18/50 (36%)	32/50 (64%)	
	3/2	26/62 (41,9%)	36/62 (58,1%)	
	2/2	14/37 (37,8%)	23/37 (62,2%)	
MTHFR	677			0,693
	C/C	28/70 (40)	42/70 (60%)	
	C/T	25/62 (40,3%)	37/62 (59,7%)	
	T/T	5/17 (29,4%)	12/17 (70,6%)	
	1298			0,992
	A/A	28/71 (69,4%)	43/71 (60,6%)	
	A/C	23/57 (40,4%)	34/57 (59,6%)	
	C/C	7/18 (38,9%)	11/18 (61,1%)	
SLC19A1	80			0,586
	G/G	14/40 (35%)	26/40 (65%)	
	G/A	26/67 (38,8%)	34/57 (61,2%)	
	A/A	18/39 (46,2%)	21/39 (53,8%)	
DHFR	680			0,242
	A/A	3/15 (20%)	12/15 (80%)	
	C/A	27/64 (42,2%)	37/64 (57,8%)	
	C/C	27/63 (42,9%)	36/63 (57,1%)	
	675			0,873
	A/A	29/75 (38,7%)	46/75 (61,3%)	
	A/G	22/54 (40,7%)	32/54 (59,3%)	
	G/G	6/13 (46,2%)	7/13 (53,8%)	
	556			0,809
	T/T	28/74 (37,8%)	46/74 (62,2%)	
	T/C	23/55 (41,8%)	32/55 (58,2%)	
	C/C	6/13 (46,2%)	7/13 (53,8%)	
	464			0,715
	A/A	27/73 (37%)	46/73 (63%)	
	A/T	24/56 (42,9%)	32/56 (57,1%)	
T/T	6/13 (46,2%)	7/13 (53,8%)		
317			0,193	
A/A	21/49 (42,9%)	28/49 (57,1%)		
A/G	31/71 (43,7%)	40/71 (56,3%)		
G/G	5/22 (22,7%)	17/22 (77,3%)		

Tabela 3. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa prose nim uzrastom

Polimorfizmi		Korelacija sa prose nom vrednoš u uzrasta		Statistička značajnost (p)
TYMS 6bp	I/I	7,1	I/I : I/D	0,045
	I/D	6,3	I/I : D/D	
	D/D	9,4	I/D : D/D	
TYMS 28bp	3/3	6,7	3/3 : 3/2	0,500
	3/2	6,8	3/3 : 2/2	
	2/2	7,8	3/2 : 2/2	
MTHFR 677	C/C	7,9	C/C : C/T	0,397
	C/T	5,9	C/C : T/T	
	T/T	6,7	C/T : T/T	
MTHFR 1298	A/A	7,9	A/A : A/C	0,079
	A/C	5,9	A/A : C/C	
	C/C	6,7	A/C : C/C	
SLC19A1	G/G	6,3	G/G : G/A	0,785
	G/A	7,4	G/G : A/A	
	A/A	7,1	G/A : A/A	
DHFR 680	A/A	6,8	A/A : C/A	0,980
	C/A	7,0	A/A : C/C	
	C/C	6,6	C/A : C/C	
DHFR 675	A/A	6,6	A/A : A/G	0,190
	A/G	7,7	A/A : G/G	
	G/G	5,5	A/G : G/G	
DHFR 556	T/T	6,5	T/T : T/C	0,131
	T/C	7,8	T/T : C/C	
	C/C	5,5	T/C : C/C	
DHFR 464	A/A	6,5	A/A : A/T	0,128
	A/T	7,8	A/A : T/T	
	T/T	5,5	A/T : T/T	
DHFR 317	A/A	6,9	A/A : A/G	0,982
	A/G	6,9	A/A : G/G	
	G/G	7,1	A/G : G/G	

Tabela 4. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima u odnosu na imunofenotip

Polimorfizmi		Imunofenotip		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		B	T		
TYMS 6 bp	I/I	62 (88,6%)	8 (11,4%)	70 (100%)	0,173
	I/D	50 (82%)	11 (18%)	61 (100%)	
	D/D	12 (70,6%)	5 (29,4%)	17 (100%)	
Ukupno		124 (83,8%)	24 (16,2%)	148 (100%)	
TYMS 28 bp	3/3	41 (82%)	9 (18%)	50 (100%)	0,362
	3/2	55 (88,7%)	7 (11,3%)	62 (100%)	
	2/2	29 (78,4%)	8 (21,6%)	37 (100%)	
Ukupno		125 (83,9%)	24 (16,1%)	149 (100%)	
MTHFR 677	C/C	59 (84,3%)	11 (15,7%)	70 (100%)	0,981
	C/T	52 (83,9%)	10 (16,1%)	62 (100%)	
	T/T	14 (82,4%)	3 (17,6%)	17 (100%)	
Ukupno		125 (83,9%)	24 (16,1%)	149 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	57 (80,3%)	14 (19,7%)	71 (100%)	0,019
	A/C	53 (93%)	4 (7%)	57 (100%)	
	C/C	12 (66,7%)	6 (33,3%)	18 (100%)	
Ukupno		122 (83,6%)	24 (16,4%)	146 (100%)	
SLC19A1	G/G	38 (95%)	2 (5%)	40 (100%)	0,064
	G/A	54 (80,6%)	13 (19,4%)	67 (100%)	
	A/A	30 (76,9%)	9 (23,1%)	39 (100%)	
Ukupno		122 (83,6%)	24 (16,4%)	146 (100%)	
DHFR 680	A/A	13 (86,7%)	2 (13,3%)	15 (100%)	0,812
	C/A	54 (84,4%)	10 (15,6%)	64 (100%)	
	C/C	51 (81%)	12 (19%)	39 (100%)	
Ukupno		118 (83,1%)	24 (16,9%)	142 (100%)	
DHFR 675	A/A	66 (88%)	9 (12%)	75 (100%)	0,014
	A/G	39 (72,2%)	15 (27,8%)	54 (100%)	
	G/G	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		118 (83,1%)	24 (16,9%)	142 (100%)	
DHFR 556	T/T	65 (87,8%)	9 (12,2%)	74 (100%)	0,018
	T/C	40 (72,7%)	15 (27,3%)	55 (100%)	
	C/C	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		118 (83,1%)	24 (16,9%)	142 (100%)	
DHFR 464	A/A	64 (87,7%)	9 (12,3%)	73 (100%)	0,022
	A/T	41 (73,2%)	15 (26,8%)	56 (100%)	
	T/T	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		118 (83,1%)	24 (16,9%)	142 (100%)	
DHFR 317	A/A	38 (77,6%)	11 (22,4%)	49 (100%)	0,440
	A/G	61 (85,9%)	10 (14,1%)	71 (100%)	
	G/G	19 (86,4%)	3 (13,6%)	22 (100%)	
Ukupno		118 (83,1%)	24 (16,9%)	142 (100%)	

Tabela 5. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa inicijalnim CNS statusom

Polimorfizmi		CNS status			Ukupno	Statistička značajnost (p)
		1	2	3		
TYMS 6 bp	I/I	64 (91,4%)	2 (2,9%)	4 (5,7%)	70 (100%)	0,896
	I/D	55 (90,2%)	4 (6,6%)	2 (3,3%)	61 (100%)	
	D/D	16 (94,1%)	0 (0%)	1 (5,9%)	17 (100%)	
Ukupno		135 (91,2%)	6 (4,1%)	7 (4,7%)	148 (100%)	
TYMS 28 bp	3/3	47 (94%)	2 (4%)	1 (2%)	50 (100%)	0,499
	3/2	57 (91,9%)	1 (1,6%)	4 (6,5%)	62 (100%)	
	2/2	32 (86,5%)	3 (8,1%)	2 (5,4%)	37 (100%)	
Ukupno		136 (91,3%)	6 (4%)	7 (4,7%)	149 (100%)	
MTFHR 677	C/C	63 (90%)	2 (5,7%)	3 (4,3%)	70 (100%)	0,523
	C/T	57 (91,9%)	2 (3,2%)	3 (4,8%)	62 (100%)	
	T/T	16 (94,1%)	0 (0%)	1 (5,9%)	17 (100%)	
Ukupno		136 (91,3%)	6 (4%)	7 (4,7%)	149 (100%)	
MTFHR 1298	A/A	66 (93%)	1 (1,4%)	4 (5,6%)	71 (100%)	0,077
	A/C	53 (93%)	2 (3,5%)	3 (3,5%)	57 (100%)	
	C/C	14 (77,8%)	3 (16,7%)	1 (5,6%)	18 (100%)	
Ukupno		133 (91,1%)	6 (4,1%)	7 (4,8%)	146 (100%)	
SLC19A1	G/G	38 (95%)	2 (5%)	0 (0%)	40 (100%)	0,750
	G/A	58 (86,6%)	3 (4,5%)	6 (9%)	67 (100%)	
	A/A	37 (34,9%)	1 (2,6%)	1 (2,6%)	39 (100%)	
Ukupno		133 (91,1%)	6 (4,1%)	7 (4,8%)	146 (100%)	
DHFR 680	A/A	15 (95%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (100%)	0,464
	C/A	58 (90,6%)	2 (3,1%)	4 (6,2%)	64 (100%)	
	C/C	57 (90,5%)	4 (6,3%)	2 (3,2%)	63 (100%)	
Ukupno		130 (91,5%)	6 (4,2%)	6 (4,2%)	142 (100%)	
DHFR 675	A/A	70 (93,3%)	2 (2,7%)	3 (4%)	75 (100%)	0,810
	A/G	47 (87%)	4 (7,4%)	3 (5,6%)	54 (100%)	
	G/G	13 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		130 (91,5%)	6 (4,2%)	6 (4,2%)	142 (100%)	
DHFR 556	T/T	69 (93,2%)	2 (2,7%)	3 (4,1%)	74 (100%)	0,826
	T/C	48 (87,3%)	4 (7,3%)	3 (5,5%)	55 (100%)	
	C/C	13 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		130 (91,5%)	6 (4,2%)	6 (4,2%)	142 (100%)	
DHFR 464	A/A	68 (93,2%)	2 (2,7%)	3 (4,1%)	73 (100%)	0,840
	A/T	49 (87,5%)	4 (7,1%)	3 (5,4%)	56 (100%)	
	T/T	13 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		130 (91,5%)	6 (4,2%)	6 (4,2%)	142 (100%)	
DHFR 317	A/A	44 (89,8%)	3 (6,1%)	2 (4,1%)	49 (100%)	0,545
	A/G	65 (91,5%)	3 (4,2%)	3 (4,2%)	71 (100%)	
	G/G	21 (95,5%)	0 (0%)	1 (4,5%)	13 (100%)	
Ukupno		130 (91,5%)	6 (4,2%)	6 (4,2%)	142 (100%)	

Tabela 6. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa kariotipom

Polimorfizmi	Kariotip							Ukupno	Statistička značajnost (p)	
	Nema mitozu	Normalan	Hipodiploidija	Hiperdiploidija	+21	Ph +	Kompleksan			
TYMS 6bp	I/I	18 (32,1%)	22 (39,3%)	1 (1,8%)	10 (17,9%)	0 (0%)	2 (3,6%)	3 (5,4%)	56 (100%)	0,022
	I/D	26 (49,1%)	19 (35,8%)	0 (0%)	4 (7,5%)	1 (1,9%)	0 (0%)	3 (5,7%)	53 (100%)	
	D/D	4 (25%)	5 (31,2%)	0 (0%)	2 (12,5%)	3 (18,8%)	0 (0%)	2 (12,5%)	16 (100%)	
Ukupno		48 (38,4%)	46 (36,8%)	1 (0,8%)	16 (12,8%)	4 (3,2%)	2 (1,6%)	8 (6,4%)	125 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	15 (36,6%)	16 (39%)	0 (0%)	6 (14,6%)	2 (4,9%)	0 (0%)	2 (4,9%)	41 (100%)	0,752
	3/2	23 (42,6%)	18 (33,3%)	0 (0%)	5 (9,3%)	3 (5,6%)	2 (3,7%)	3 (5,6%)	54 (100%)	
	2/2	10 (32,3%)	12 (38,7%)	1 (3,2%)	5 (16,1%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (9,7%)	31 (100%)	
Ukupno		48 (38,1%)	46 (36,5%)	1 (0,8%)	16 (12,7%)	5 (4%)	2 (1,6%)	8 (6,3%)	126 (100%)	
MTHFR 677	C/C	24 (38,7%)	23 (37,1%)	1 (1,6%)	7 (11,3%)	1 (1,6%)	2 (3,2%)	4 (6,5%)	62 (100%)	0,713
	C/T	19 (39,6%)	16 (33,3%)	0 (0%)	7 (14,6%)	4 (8,3%)	0 (0%)	2 (4,2%)	48 (100%)	
	T/T	5 (31,2%)	7 (43,8%)	0 (0%)	2 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (12,5%)	16 (100%)	
Ukupno		48 (38,1%)	46 (36,5%)	1 (0,8%)	16 (12,7%)	5 (4%)	2 (1,6%)	8 (6,3%)	126 (100%)	
MTFHR 1298	A/A	24 (40%)	23 (38,3%)	0 (0%)	8 (13,7%)	2 (3,3%)	1 (1,7%)	2 (3,3%)	60 (100%)	0,370
	A/C	21 (43,8%)	15 (31,2%)	1 (2,1%)	7 (14,6%)	1 (2,1%)	1 (2,1%)	2 (4,2%)	48 (100%)	
	C/C	2 (13,3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,7%)	1 (0,8%)	0 (0%)	4 (26,7%)	15 (100%)	
Ukupno		47 (38,2%)	1 (0,8%)	1 (0,8%)	16 (13%)	3 (2,4%)	2 (1,6%)	8 (6,5%)	123 (100%)	
SLC 19A1	G/G	18 (58,1%)	8 (25,8%)	0 (0%)	5 (16,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	31 (100%)	0,240
	G/A	17 (27,4%)	27 (43,5%)	0 (0%)	9 (14,5%)	2 (3,2%)	2 (3,2%)	5 (8,1%)	62 (100%)	
	A/A	12 (40%)	11 (36,7%)	1 (3,3%)	2 (6,7%)	1 (3,3%)	0 (0%)	3 (10%)	30 (100%)	
Ukupno		47 (38,2%)	46 (37,4%)	1 (0,8%)	16 (13%)	3 (2,4%)	2 (1,6%)	8 (6,5%)	123 (100%)	
DHFR 680	A/A	2 (15,4%)	6 (46,2%)	0 (0%)	4 (30,8%)	1 (7,7%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (100%)	0,295
	C/A	25 (49%)	15 (29,4%)	1 (2%)	6 (11,8%)	1 (2%)	0 (0%)	3 (5,9%)	51 (100%)	
	C/C	19 (34,5%)	24 (43,6%)	0 (0%)	6 (10,9%)	0 (0%)	1 (1,8%)	5 (9,1%)	55 (100%)	
Ukupno		46 (38,7%)	45 (37,8%)	1 (0,8%)	16 (13,4%)	2 (1,7%)	1 (0,8%)	8 (6,7%)	119 (100%)	
DHFR 675	A/A	22 (35,5%)	24 (38,7%)	1 (1,6%)	11 (17,7%)	1 (1,6%)	1 (1,6%)	2 (3,2%)	62 (100%)	0,466
	A/G	18 (40%)	15 (33,3%)	0 (0%)	5 (11,1%)	1 (2,2%)	0 (0%)	6 (13,3%)	45 (100%)	
	G/G	6 (50%)	6 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (100%)	
Ukupno		46 (38,7%)	45 (37,8%)	1 (0,8%)	16 (13,4%)	2 (1,7%)	1 (0,8%)	8 (6,7%)	119 (100%)	
DHFR 556	T/T	22 (36,1%)	24 (39,3%)	1 (1,6%)	10 (16,4%)	1 (1,6%)	1 (1,6%)	2 (3,3%)	61 (100%)	0,613
	T/C	18 (39,1%)	15 (32,6%)	0 (0%)	6 (13%)	1 (2,2%)	0 (0%)	6 (13%)	46 (100%)	
	C/C	6 (50%)	6 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (100%)	
Ukupno		46 (38,7%)	45 (37,8%)	1 (0,8%)	16 (13,4%)	2 (1,7%)	1 (0,8%)	8 (6,7%)	119 (100%)	
DHFR 464	A/A	22 (36,1%)	24 (39,3%)	1 (1,6%)	10 (16,4%)	1 (1,6%)	1 (1,6%)	2 (3,3%)	61 (100%)	0,613
	A/T	18 (39,1%)	15 (32,6%)	0 (0%)	6 (13%)	1 (2,2%)	0 (0%)	6 (13%)	46 (100%)	
	T/T	6 (50%)	6 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (100%)	
Ukupno		46 (38,7%)	45 (37,8%)	1 (0,8%)	16 (13,4%)	2 (1,7%)	1 (0,8%)	8 (6,7%)	119 (100%)	
DHFR 317	A/A	15 (34,1%)	21 (47,7%)	0 (0%)	3 (6,8%)	0 (0%)	1 (2,3%)	4 (9,1%)	44 (100%)	0,170
	A/G	26 (46,4%)	16 (28,6%)	1 (1,8%)	8 (14,3%)	1 (1,8%)	0 (0%)	4 (7,1%)	56 (100%)	
	G/G	5 (26,3%)	8 (42,1%)	0 (0%)	5 (26,3%)	1 (5,3%)	0 (0%)	0 (0%)	19 (100%)	
Ukupno		46 (38,7%)	45 (37,8%)	1 (0,8%)	16 (13,4%)	2 (1,7%)	1 (0,8%)	8 (6,7%)	119 (100%)	

Tabela 7. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa molekularno genetskim rearanžmanima

Polimorfizmi		Molekularna genetika					Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Negativno	BCR/ABL	MLL/AF4	TEL/AML1	E2A/PBX1		
TYMS 6bp	I/I	41 (61,2%)	4 (6%)	1 (1,5%)	17 (25,4%)	4 (6%)	67 (100%)	0,939
	I/D	40 (66,7%)	3 (5%)	2 (3,3%)	13 (21,7%)	2 (3,3%)	60 (100%)	
	D/D	10 (62,5%)	2 (12,5%)	0 (0%)	3 (18,8%)	1 (6,2%)	16 (100%)	
Ukupno		91 (63,6%)	9 (6,3%)	3 (2,1%)	33 (23,1%)	7 (4,9%)	143 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	45 (66,2%)	5 (7,4%)	3 (4,4%)	16 (28,6%)	3 (4,4%)	68 (100%)	0,467
	3/2	32 (57,1%)	4 (7,1%)	0 (0%)	5 (27,8%)	4 (7,1%)	56 (100%)	
	2/2	13 (72,2%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (18,8%)	0 (0%)	18 (100%)	
Ukupno		90 (63,4%)	9 (6,3%)	3 (2,1%)	33 (23,2%)	7 (4,9%)	142 (100%)	
MTHFR 677	C/C	23 (57,5%)	3 (7,5%)	0 (0%)	11 (27,5%)	3 (7,5%)	40 (100%)	0,753
	C/T	43 (67,2%)	3 (4,7%)	3 (4,7%)	13 (20,3%)	2 (3,1%)	64 (100%)	
	T/T	24 (63,2%)	3 (7,9%)	0 (0%)	9 (23,7%)	2 (5,3%)	38 (100%)	
Ukupno		90 (63,4%)	9 (6,3%)	3 (2,1%)	33 (23,2%)	7 (4,9%)	142 (100%)	
MTFHR 1298	A/A	43 (66,2%)	5 (7,4%)	3 (4,4%)	12 (17,6%)	3 (4,4%)	68 (100%)	0,279
	A/C	32 (57,1%)	4 (7,1%)	0 (0%)	16 (28,6%)	4 (7,1%)	56 (100%)	
	C/C	13 (72,2%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (27,8%)	0 (0%)	18 (100%)	
Ukupno		90 (63,4%)	9 (6,3%)	3 (2,1%)	33 (23,2%)	7 (4,9%)	142 (100%)	
SLC 19A1	G/G	23 (57,5%)	3 (7,5%)	0 (0%)	11 (27,5%)	3 (7,5%)	40 (100%)	0,978
	G/A	43 (67,2%)	3 (4,7%)	3 (4,7%)	13 (20,3%)	2 (3,1%)	64 (100%)	
	A/A	24 (63,2%)	3 (7,9%)	0 (0%)	9 (23,7%)	2 (5,3%)	38 (100%)	
Ukupno		90 (63,4%)	9 (6,3%)	3 (2,1%)	33 (23,2%)	7 (4,9%)	142 (100%)	
DHFR 680	A/A	8 (53,3%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (33,3%)	2 (13,2%)	15 (100%)	0,571
	C/A	43 (68,3%)	3 (4,8%)	2 (3,2%)	12 (19%)	3 (4,8%)	63 (100%)	
	C/C	38 (62,3%)	5 (8,2%)	1 (1,6%)	15 (24,6%)	2 (3,3%)	61 (100%)	
Ukupno		89 (64%)	8 (5,8%)	3 (2,2%)	32 (23%)	7 (5%)	139 (100%)	
DHFR 675	A/A	43 (58,1%)	5 (6,8%)	2 (2,7%)	23 (27%)	4 (5,4%)	74 (100%)	0,773
	A/G	39 (73,6%)	2 (3,8%)	1 (1,9%)	9 (17%)	2 (3,8%)	53 (100%)	
	G/G	7 (58,3%)	1 (8,3%)	0 (0%)	3 (25%)	1 (8,3%)	12 (100%)	
Ukupno		89 (64%)	8 (5,8%)	3 (2,2%)	32 (23%)	7 (5%)	139 (100%)	
DHFR 556	T/T	43 (58,9%)	5 (6,8%)	2 (2,7%)	19 (26%)	4 (5,5%)	73 (100%)	0,859
	T/C	39 (72,2%)	2 (3,7%)	1 (1,9%)	10 (18,5%)	2 (3,7%)	54 (100%)	
	C/C	7 (58,3%)	1 (8,3%)	0 (0%)	3 (25%)	1 (8,3%)	12 (100%)	
Ukupno		89 (64%)	8 (5,8%)	3 (2,2%)	32 (23%)	7 (5%)	139 (100%)	
DHFR 464	A/A	23 (58,3%)	5 (6,9%)	2 (2,8%)	19 (26,4%)	4 (5,6%)	72 (100%)	0,817
	A/T	40 (72,7%)	2 (3,6%)	1 (1,8%)	10 (18,2%)	2 (3,6%)	55 (100%)	
	T/T	7 (58,3%)	1 (8,3%)	0 (0%)	3 (25%)	1 (8,3%)	12 (100%)	
Ukupno		89 (64%)	8 (5,8%)	3 (2,2%)	32 (23%)	7 (5%)	139 (100%)	
DHFR 317	A/A	28 (59,6%)	4 (8,5%)	1 (2,1%)	13 (27,7%)	1 (2,1%)	47 (100%)	0,580
	A/G	48 (68,6%)	3 (4,3%)	1 (1,4%)	14 (20%)	4 (5,7%)	70 (100%)	
	G/G	13 (59,1%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)	5 (22,7%)	2 (9,1%)	22 (100%)	
Ukupno		89 (64%)	8 (5,8%)	3 (2,2%)	32 (23%)	7 (5%)	139 (100%)	

4.5. Korelacija varijanti u ispitivanim genima sa parametrima koji u estvuju u proceni odgovora na terapiju

Uinjeno je poređenje genetičkih varijanti u odnosu na odgovor na terapiju, u različitim vremenskim intervalima, što ukazuje na povezanost polimorfizama sa brzinom ulaska u CR.

Nije viđena asocijacija ispitivanih polimorfizama i odgovora na kortiko-steroidnu terapiju 8. dana lečenja, što je prikazano u Tabeli 8.

Viđena je značajna korelacija pojedinih polimorfizama sa sporijom kinetikom blasta 15. dana lečenja, procenjeno morfološkim pregledom koštane srži: varijante 6bp ($p=0,037$) i 28 bp ($p=0,025$) u genu za *TYMS* i varijante -680 C>A ($p=0,011$) i -317 A>G ($p=0,009$) u genu za *DHFR*, što je prikazano u Tabeli 9.

Procena odgovora na terapiju 15. dana lečenja, merena prototom citometrijom, nije pokazala povezanost sa ispitivanim polimorfizmima (Tabela 10).

Varijante u ispitivanim genima nisu korelirale sa CR 33. dana terapije, procenjenom morfološkim pregledom koštane srži, što je predstavljeno u Tabeli 11.

Tabela 8. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima i odgovora na terapiju 8. dana

Polimorfizmi		Odgovor na terapiju 8. dana		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		ABB < 1000	ABB ≥ 1000		
TYMS 6bp	I/I	64 (91,4%)	6 (8,6%)	70 (100%)	0,359
	I/D	57 (93,4%)	4 (6,6%)	61 (100%)	
	D/D	14 (82,4%)	3 (17,6%)	17 (100%)	
Ukupno		135 (91,2%)	13 (8,8%)	148 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	45 (90%)	5 (10%)	50 (100%)	0,735
	3/2	57 (91,9%)	5 (8,1%)	62 (100%)	
	2/2	34 (91,9%)	3 (8,1%)	37 (100%)	
Ukupno		136 (91,3%)	13 (8,7%)	149 (100%)	
MTHFR 677	C/C	63 (90%)	7 (10%)	70 (100%)	0,690
	C/T	58 (93,5%)	4 (6,5%)	62 (100%)	
	T/T	15 (88,2%)	2 (11,8%)	17 (100%)	
Ukupno		136 (91,3%)	13 (8,7%)	149 (100%)	
MTFHR 1298	A/A	66 (93%)	5 (7%)	71 (100%)	0,440
	A/C	52 (91,2%)	5 (8,8%)	57 (100%)	
	C/C	15 (83,8%)	3 (16,7%)	18 (100%)	
Ukupno		133 (91,1%)	13 (8,9%)	146 (100%)	
SLC19A1	G/G	37 (92,5%)	3 (7,5%)	40 (100%)	0,971
	G/A	60 (89,6%)	7 (10,4%)	67 (100%)	
	A/A	36 (92,3%)	3 (7,7%)	39 (100%)	
Ukupno		133 (91,1%)	13 (8,9%)	146 (100%)	
DHFR 680	A/A	14 (93,3%)	1 (6,7%)	15 (100%)	0,075
	C/A	62 (96,9%)	2 (3,1%)	64 (100%)	
	C/C	54 (85,7%)	9 (14,3%)	63 (100%)	
Ukupno		130 (91,5%)	12 (8,5%)	142 (100%)	
DHFR 675	A/A	72 (96%)	3 (4%)	75 (100%)	0,082
	A/G	46 (85,2%)	8 (14,8%)	54 (100%)	
	G/G	12 (92,3%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
Ukupno		130 (91,5%)	12 (8,5%)	142 (100%)	
DHFR 556	T/T	71 (95,9%)	3 (4,1%)	74 (100%)	0,090
	T/C	47 (85,5%)	8 (14,5%)	55 (100%)	
	C/C	12 (92,3%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
Ukupno		130 (91,5%)	12 (8,5%)	142 (100%)	
DHFR 464	A/A	70 (95,9%)	3 (4,1%)	73 (100%)	0,100
	A/T	48 (85,7%)	8 (14,3%)	56 (100%)	
	T/T	12 (92,3%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
Ukupno		130 (91,5%)	12 (8,5%)	142 (100%)	
DHFR 317	A/A	42 (85,7%)	7 (14,3%)	49 (100%)	0,089
	A/G	67 (94,4%)	4 (5,6%)	71 (100%)	
	G/G	21 (95,5%)	1 (4,5%)	22 (100%)	
Ukupno		130 (91,5%)	12 (8,5%)	142 (100%)	

Tabela 9. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa mijelogramom 15. dana

Polimorfizmi		Odgovor na terapiju 15. dana			Ukupno	Statistička značajnost (p)
		M1	M2	M3		
TYMS 6bp	I/I	55 (78,6%)	14 (20%)	1 (1,4%)	70 (100%)	0,037
	I/D	52 (85,2%)	8 (13,1%)	1 (1,6%)	61 (100%)	
	D/D	13 (76,5%)	1 (5,9%)	3 (17,6%)	17 (100%)	
Ukupno		120 (81,1%)	23 (15,5%)	5 (3,4%)	148 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	42 (84%)	4 (8%)	4 (8%)	50 (100%)	0,025
	3/2	50 (80,6%)	11 (17,7%)	1 (1,6%)	62 (100%)	
	2/2	29 (78,4%)	8 (21,6%)	0 (0%)	37 (100%)	
Ukupno		121 (81,2%)	23 (15,4%)	5 (3,4%)	149 (100%)	
MTHFR 677	C/C	54 (77,1%)	14 (20%)	2 (2,9%)	70 (100%)	0,279
	C/T	51 (82,3%)	8 (12,9%)	3 (4,8%)	62 (100%)	
	T/T	16 (94,1%)	1 (5,8%)	0 (0%)	17 (100%)	
Ukupno		121 (81,2%)	23 (15,4%)	5 (3,4%)	149 (100%)	
MTFHR 1298	A/A	60 (84,5%)	8 (11,3%)	3 (4,2%)	71 (100%)	0,456
	A/C	44 (77,2%)	12 (21,1%)	1 (1,8%)	57 (100%)	
	C/C	14 (77,8%)	3 (16,7%)	1 (5,6%)	18 (100%)	
Ukupno		118 (80,8%)	23 (15,8%)	5 (3,4%)	146 (100%)	
SLC19A1	G/G	33 (82,5%)	5 (12,5%)	2 (5%)	40 (100%)	0,692
	G/A	54 (80,6%)	11 (16,4%)	2 (3%)	67 (100%)	
	A/A	31 (79,5%)	7 (17,9%)	1 (2,6%)	39 (100%)	
Ukupno		118 (80,8%)	23 (15,8%)	5 (3,4%)	146 (100%)	
DHFR 680	A/A	14 (93,3%)	1 (6,7%)	0 (0%)	15 (100%)	0,011
	C/A	57 (89,1%)	5 (7,8%)	2 (3,1%)	64 (100%)	
	C/C	44 (69,8%)	16 (25,4%)	3 (4,8%)	63 (100%)	
Ukupno		115 (81%)	22 (15,5%)	5 (3,5%)	142 (100%)	
DHFR 675	A/A	64 (85,3%)	10 (13,3%)	1 (1,3%)	75 (100%)	0,225
	A/G	41 (75,9%)	10 (18,5%)	3 (5,6%)	54 (100%)	
	G/G	10 (76,9%)	2 (15,4%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
Ukupno		115 (81%)	22 (15,5%)	5 (3,5%)	142 (100%)	
DHFR 556	T/T	64 (86,5%)	9 (12,2%)	1 (1,4%)	74 (100%)	0,170
	T/C	41 (74,5%)	11 (20%)	3 (5,5%)	55 (100%)	
	C/C	10 (76,9%)	2 (15,4%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
Ukupno		115 (81%)	22 (15,5%)	5 (3,5%)	142 (100%)	
DHFR 464	A/A	63 (86,3%)	9 (12,3%)	1 (1,4%)	73 (100%)	0,190
	A/T	42 (75%)	11 (19,6%)	3 (5,4%)	56 (100%)	
	T/T	10 (76,9%)	2 (15,4%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
Ukupno		115 (81%)	22 (15,5%)	5 (3,5%)	142 (100%)	
DHFR 317	A/A	33 (67,3%)	12 (24,5%)	4 (8,2%)	49 (100%)	0,009
	A/G	62 (87,3%)	8 (11,3%)	1 (1,4%)	71 (100%)	
	G/G	20 (90,9%)	2 (9,1%)	0 (0%)	22 (100%)	
Ukupno		115 (81%)	22 (15,5%)	5 (3,5%)	142 (100%)	

Tabela 10. Korelacija polimorfizama u svim ispitivanim genima sa MRD 15. dana
le enja

Polimorfizmi		MRD 15. dana			Ukupno	Statistička značajnost (p)
		≤ 0,1%	0,1 - 10%	≥ 10%		
TYMS 6bp	I/I	2 (12,5%)	13 (81,2%)	1 (6,2%)	16 (100%)	0,438
	I/D	3 (23,1%)	9 (69,2%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
	D/D	0 (0%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7 (100%)	
Ukupno		5 (13,9%)	27 (75%)	4 (11,1%)	36 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	2 (18,2%)	7 (63,6%)	2 (18,2%)	11 (100%)	0,488
	3/2	1 (5,9%)	14 (82,3%)	2 (11,8%)	17 (100%)	
	2/2	2 (25%)	6 (75%)	0 (0%)	8 (100%)	
Ukupno		5 (13,9%)	27 (75%)	4 (11,1%)	36 (100%)	
MTHFR 677	C/C	2 (11,8%)	12 (70,6%)	3 (17,6%)	17 (100%)	0,448
	C/T	2 (13,3%)	12 (80%)	1 (6,7%)	15 (100%)	
	T/T	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)	4 (100%)	
Ukupno		5 (13,9%)	27 (75%)	4 (11,1%)	36 (100%)	
MTFHR 1298	A/A	3 (16,7%)	14 (77,8%)	1 (5,6%)	18 (100%)	0,256
	A/C	2 (15,4%)	10 (76,9%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
	C/C	0 (0%)	3 (60%)	2 (40%)	5 (100%)	
Ukupno		5 (13,9%)	27 (75%)	4 (11,1%)	36 (100%)	
SLC19A1	G/G	1 (9,1%)	7 (63,6%)	3 (27,3%)	11 (100%)	0,354
	G/A	2 (12,5%)	14 (87,5%)	0 (0%)	16 (100%)	
	A/A	2 (22,2%)	6 (66,7%)	1 (11,1%)	9 (100%)	
Ukupno		5 (13,9%)	27 (75%)	4 (11,1%)	36 (100%)	
DHFR 680	A/A	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	0,926
	C/A	2 (12,5%)	12 (75%)	2 (12,5%)	16 (100%)	
	C/C	3 (15,8%)	14 (73,7%)	2 (10,5%)	19 (100%)	
Ukupno		5 (13,9%)	27 (75%)	4 (11,1%)	36 (100%)	
DHFR 675	A/A	5 (26,3%)	12 (63,2%)	2 (10,5%)	19 (100%)	0,098
	A/G	0 (0%)	11 (91,7%)	1 (8,3%)	12 (100%)	
	G/G	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)	5 (100%)	
Ukupno		5 (13,9%)	27 (75%)	4 (11,1%)	36 (100%)	
DHFR 556	T/T	5 (27,8%)	11 (61,1%)	2 (11,1%)	18 (100%)	0,077
	T/C	0 (0%)	12 (92,3%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
	C/C	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)	5 (100%)	
Ukupno		5 (13,9%)	27 (75%)	4 (11,1%)	36 (100%)	
DHFR 464	A/A	5 (27,8%)	11 (61,1%)	2 (11,1%)	18 (100%)	0,077
	A/T	0 (0%)	12 (92,3%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
	T/T	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)	5 (100%)	
Ukupno		5 (13,9%)	27 (75%)	4 (11,1%)	36 (100%)	
DHFR 317	A/A	2 (11,2%)	13 (72,2%)	3 (16,6%)	18 (100%)	0,394
	A/G	2 (15,4%)	11 (84,6%)	0 (0%)	13 (100%)	
	G/G	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)	5 (100%)	
Ukupno		5 (13,9%)	27 (75%)	4 (11,1%)	36 (100%)	

Tabela 11. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa mijelogramom 33. dana

Polimorfizmi		Odgovor na terapiju 33. dana		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		M1	M3		
TYMS 6bp	I/I	70 (100%)	0 (0%)	70 (100%)	0,091
	I/D	61 (100%)	0 (0%)	61 (100%)	
	D/D	16 (94,1%)	1 (5,9%)	17 (100%)	
Ukupno		147 (99,3%)	1 (0,7%)	148 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	49 (98%)	1 (2%)	50 (100%)	0,219
	3/2	62 (100%)	0 (0%)	62 (100%)	
	2/2	37 (100%)	0 (0%)	37 (100%)	
Ukupno		148 (99,3%)	1 (0,7%)	149 (100%)	
MTHFR 677	C/C	70 (100%)	0 (0%)	70 (100%)	0,497
	C/T	61 (98,4%)	1 (1,6%)	62 (100%)	
	T/T	17 (100%)	0 (0%)	17 (100%)	
Ukupno		148 (99,3%)	1 (0,7%)	149 (100%)	
MTFHR 1298	A/A	70 (98,6%)	1 (1,4%)	71 (100%)	0,327
	A/C	57 (100%)	0 (0%)	57 (100%)	
	C/C	18 (100%)	0 (0%)	18 (100%)	
Ukupno		145 (99,3%)	1 (0,7%)	146 (100%)	
SLC19A1	G/G	39 (97,5%)	1 (2,5%)	40 (100%)	0,176
	G/A	67 (100%)	0 (0%)	67 (100%)	
	A/A	39 (100%)	0 (0%)	39 (100%)	
Ukupno		145 (99,3%)	1 (0,7%)	146 (100%)	
DHFR 680	A/A	15 (100%)	0 (0%)	15 (100%)	0,287
	C/A	64 (100%)	0 (0%)	64 (100%)	
	C/C	62 (98,4%)	1 (1,6%)	63 (100%)	
Ukupno		141 (99,3%)	1 (0,7%)	142 (100%)	
DHFR 675	A/A	74 (98,7%)	1 (1,3%)	75 (100%)	0,360
	A/G	54 (100%)	0 (0%)	54 (100%)	
	G/G	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		141 (99,3%)	1 (0,7%)	142 (100%)	
DHFR 556	T/T	73 (98,6%)	1 (1,4%)	74 (100%)	0,354
	T/C	55 (100%)	0 (0%)	55 (100%)	
	C/C	13 (100%)	0 (0%)	15 (100%)	
Ukupno		141 (99,3%)	1 (0,7%)	142 (100%)	
DHFR 464	A/A	72 (98,6%)	1 (1,4%)	73 (100%)	0,347
	A/T	56 (100%)	0 (0%)	56 (100%)	
	T/T	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		141 (99,3%)	1 (0,7%)	142 (100%)	
DHFR 317	A/A	48 (98%)	1 (2%)	49 (100%)	0,213
	A/G	71 (100%)	0 (0%)	71 (100%)	
	G/G	22 (100%)	0 (0%)	22 (100%)	
Ukupno		141 (99,3%)	1 (0,7%)	142 (100%)	

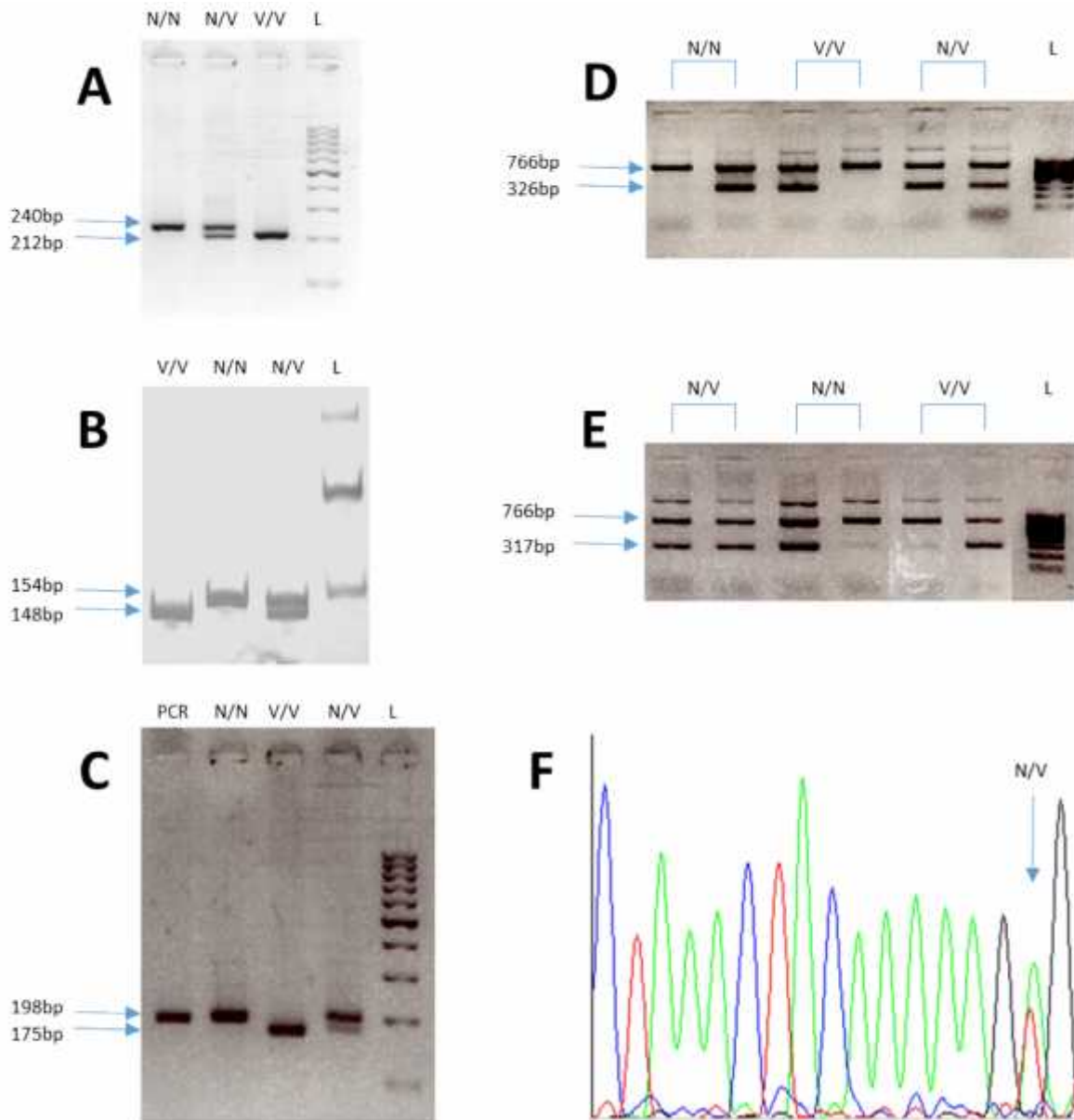
4.6. Analiza geneti kih varijacija potencijalno važnih za toksi nost MTX

Navedeni inicijalni prognosti ki faktori, kao i parametri procene odgovora na terapiju, nezavisno uti u na ishod dece obolele od ALL. U injena korelacija je pokazala da li i u kojoj meri ispitivane geneti ke varijante doprinose ve etabliranoj stratifikaciji rizika. Me utim, detekcija polimorfizma nije mora biti dovoljna. Za predvi anje odgovora na terapiju, pored detekcije pojedina nih varijacija u genu, može biti važno koje geneti ke varijante pacijent nosi na svakom od pojedina nih hromozoma. Iz tog razloga je istraženo da li se neke geneti ke varijacije nalaze u gametskoj neravnoteži vezanosti (engl. *Linkage disequilibrium* – LD). U genima *TYMS*, *MTHFR* i *DHFR* izu avano je više od jedne geneti ke varijacije. Odre ene su u estalosti naj eš ih haplotipova, kao i ja ina veze izme u geneti kih varijanti. Na Tabeli 12 su prikazana 4 naj eš a haplotipa (H1 – H4).

Tabela 12. U estalosti haplotipova u genima *TYMS*, *MTHFR* i *DHFR*

<i>TYMS</i> *	H1	H2	H3	H4
Broj ponovaka u 5'UTR-u	2	3	3	2
Indel u 3'UTR-u	Ins	Ins	Del	Del
U estalost	36.3%	30.4%	24.6%	8.2%
<i>MTHFR</i>	H1	H2	H3	H4
c.677 C>T	C	T	C	T
c.1298 A>C	A	A	C	C
U estalost	40.2%	30.4%	28.3%	1.1%
<i>DHFR</i> *	H1	H2	H3	H4
-680 C>A	A	C	C	C
-675 A>G	A	A	A	G
-556 T>C	T	T	T	C
-464 A>T	A	A	A	T
-317 A>G	G	A	G	A
U estalost	32.4%	31.6%	7.1%	26.1%

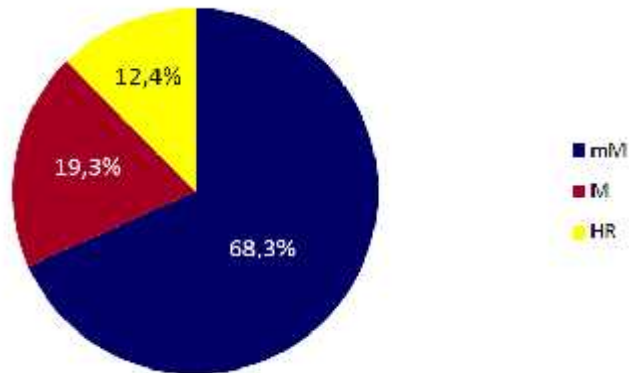
U genu *TYMS* je dobijeno da je dupli tandemski ponovak u promotoru (*TYMS* 2R) asociran sa insercijom od 6bp u 3'UTR-u (*TYMS* 6bp+), kao i trostruki tandemski ponovak (*TYMS* 3R) sa delecijom od 6bp u 3'UTR-u (*TYMS* 6bp-) ($r^2=0.14$). U genu *MTHFR*, varijanta c.677C je asocirana sa c.1298C, kao i varijanta c.677T sa c.1298A varijantom ($r^2=0.14$). U genu *DHFR* je na eno da postoji najja a asocijacija izme u -680 C>A i -317 A>G ($r^2=0.69$) sa jedne strane i -675 A>G, -556 T>C i -464 A>T (vrednosti za r^2 su bile izme u 0.94 i 0.96), sa druge. Detekcija geneti kih varijacija potencijalno važnih za odgovor na terapiju MTX je prikazana na Slici 5.



Slika 5. Detekcija geneti kih varijacija potencijalno važnih za odgovor na terapiju MTX. Prikazana je detekcija (A) broja ponovaka u 5'UTR-u gena *TYMS* i (B) *TYMS* indel u 3'UTR-u PCR metodom; (C) detekcija *MTHFR* c.677 C>T PCR-RFLP metodom; (D) detekcija *MTHFR*c.1298 A>C i (E) *SLC19A1* c.80 G>A AS-PCR-om; (F) detekcija *DHFR* -464 A>T metodom sekvenciranja (prikazan je elektroferogram dobijen sekvenciranjem dela promotora gena *DHFR*, a varijabilno mesto je označeno strelicom). N/N – homozigotni nosilac referentnog alela. V/V – homozigotni nosilac varijantnog (re eg) alela. N/V – heterozigotni nosilac. L – molekulska lestvica (*Gene Ruler 100bp DNA Ladder, Thermo Scientific*). PCR – nedigerirani PCR fragment.

4.7. Distribucija pacijenata prema razli itom modalitetu terapije metotreksatom

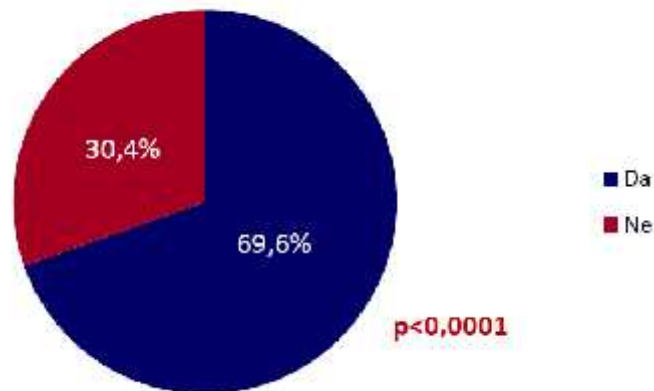
Kao što je u uvodu navedeno i prikazano u poglavlju materijal i metode, pacijenti se u odnosu na brojne parametre dele na one koji primaju MTX u dozi od 2 g/m² i 5 g/m² u fazi konsolidacije. Protokol mM (MTX u dozi od 2 g/m²) je primalo 109 dece (68,3%), protokol M (MTX u dozi od 5 g/m²) je ordiniran u 31 deteta (19,3%), dok je na terapiji HR blokovima (MTX u dozi od 5 g/m², uz druge citostatske agense) bilo 21 dete (12,4%). Na Grafikonu 13 je prikazana distribucija dece obolele od ALL u odnosu na primenjen terapijski modalitet.



Grafikon 13. Distribucija ispitanika u odnosu na primenjenu granu le enja

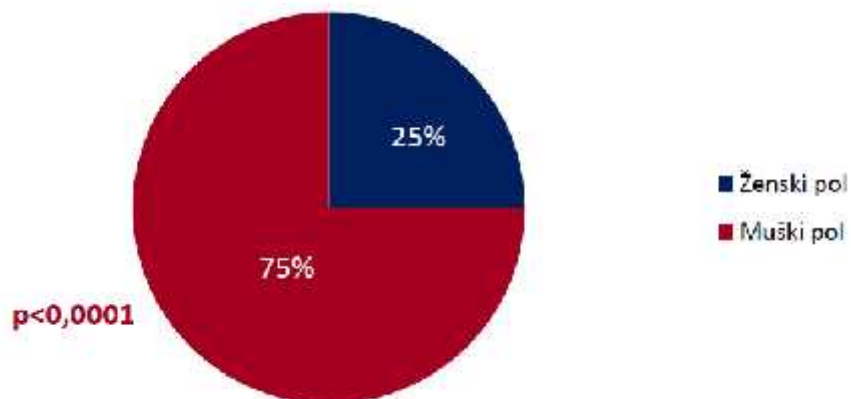
4.8. Distribucija pacijenata u odnosu na ukupno ispoljenu toksi nost tokom terapije metotreksatom

Ukupna toksi nost podrazumeva sve terapijske modalitete MTX, bez obzira na dozni režim, kao i sve vrste toksi nosti, ija je detekcija obuhva ena ovom studijom. Pokazano je da je više od 2/3 dece (112/161) ispoljilo zbirne neželjene efekte primene MTX ($p<0,0001$), što je predstavljeno na Grafikonu 14.



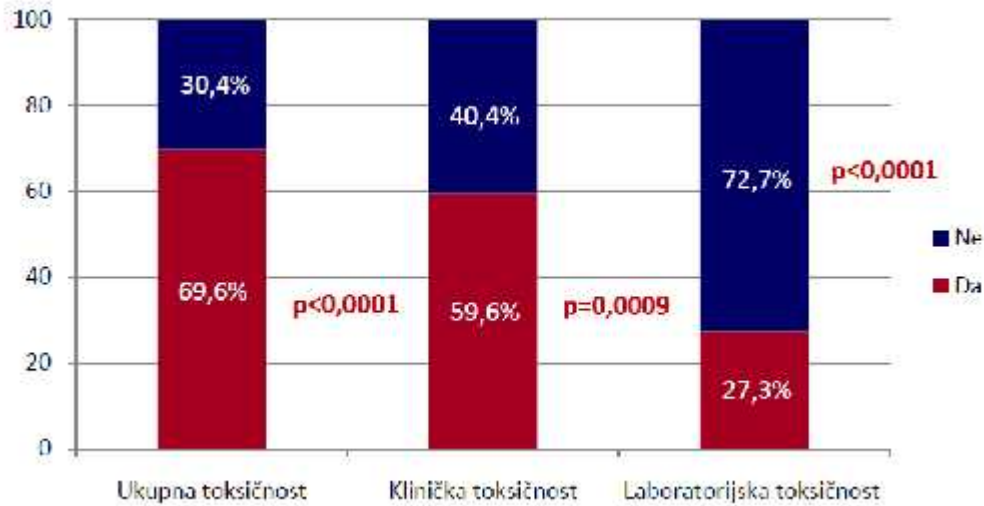
Grafikon 14. Distribucija ispitanika u odnosu na ukupno ispoljenu toksi nost

U injena je korelacija ukupne toksi nosti sa polom i pokazano je da su de aci zna ajno eš e ($p<0,0001$) razvili neželjene efekte tokom primene MTX (121/161), što je predstavljeno na Grafikonu 15.



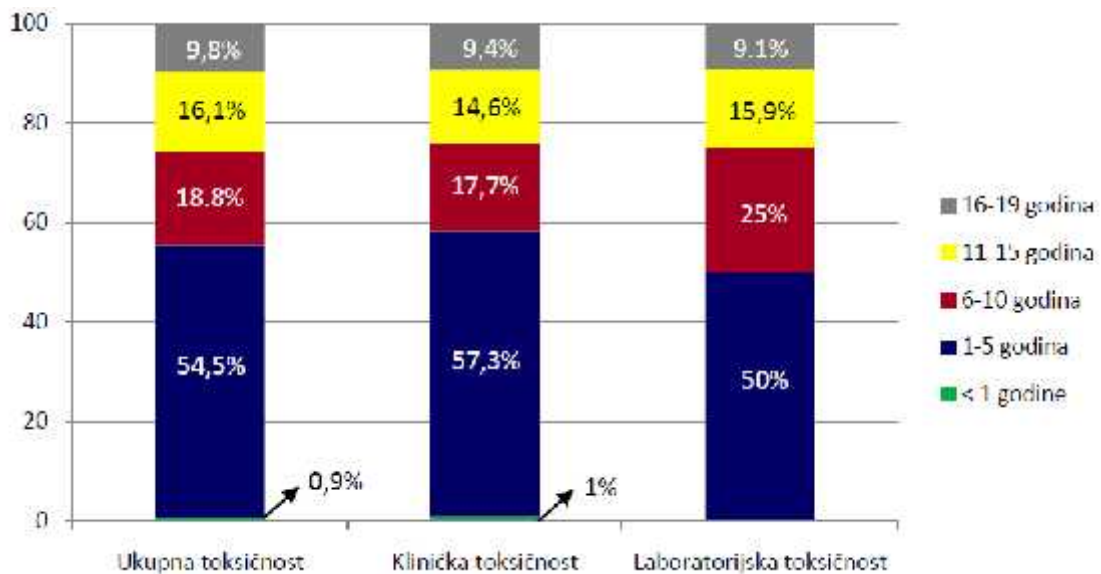
Grafikon 15. Distribucija ispitanika po polu u odnosu na ukupnu toksi nost

Ukupna toksi nost je podeljena na klini ku i laboratorijsku i pokazano je da je ukupnoj toksi nosti doprinela klini ka (96/161), koja se statisti ki zna ajno eš e (p=0,0009) manifestovala od laboratorijske (44/161). Podela toksi nosti je predstavljena na Grafikonu 16.



Grafikon 16. Distribucija ispitanika u odnosu na toksi nost MTX

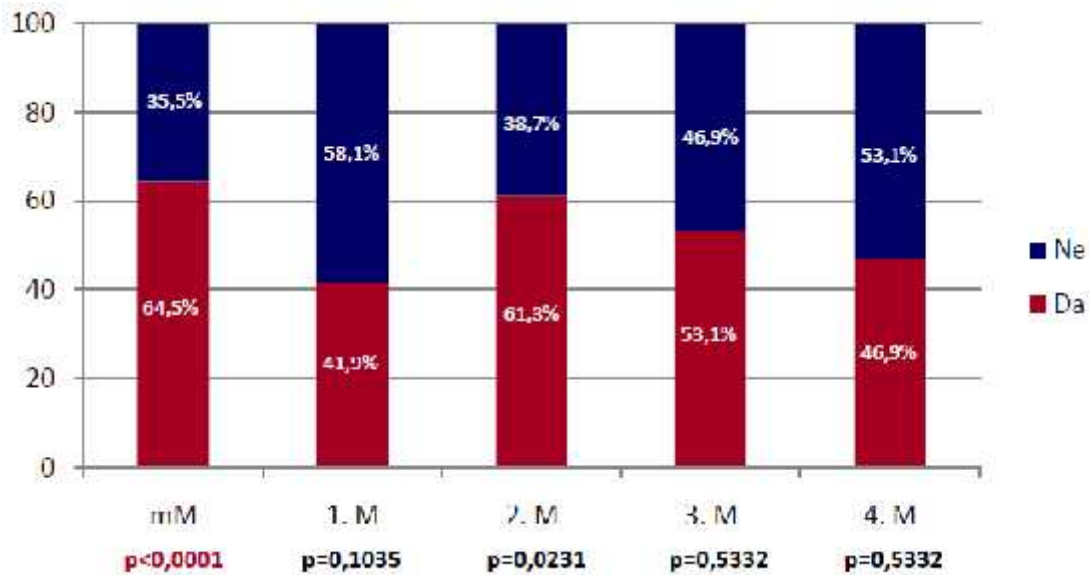
Distribucija bolesnika u odnosu na grupe uzrasta je pratila i pojava toksi nosti MTX, što se nije pokazalo statisti ki zna ajnim (Grafikon 17).



Grafikon 17. Distribucija ispitanika po uzrastu u odnosu na toksi nost MTX

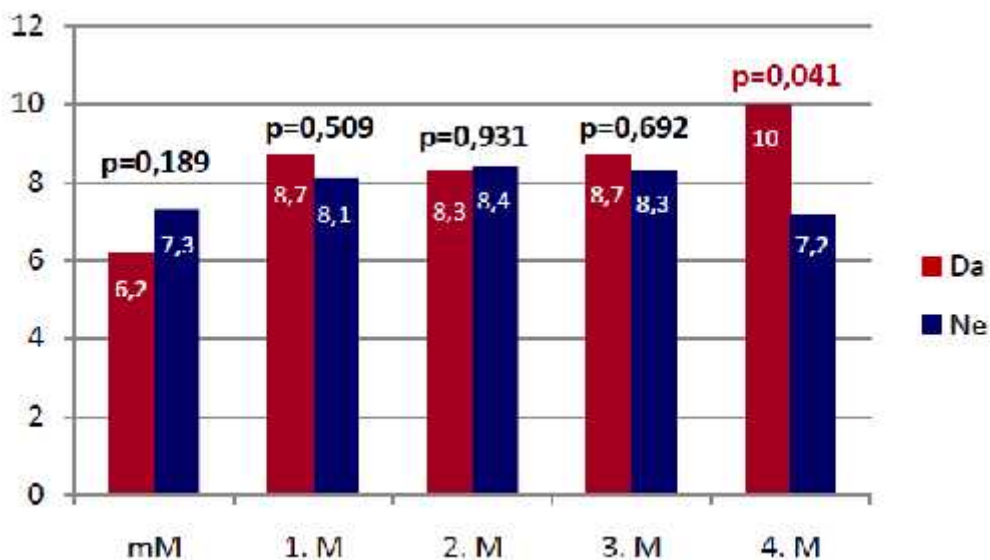
Obzirom da je doza MTX u protokolu mM značajno niža od protokola M, četiri ciklusa terapije tokom primene 2 g/m^2 su prikazana zbirno, dok je primena četiri ciklusa MTX u dozi od 5 g/m^2 predstavljena pojedinačno. Način sumiranja toksičnosti je jasno determinisan u oba primenjena terapijska protokola.

Tokom četiri ciklusa u protokolu mM je zabeležena statistički značajnija ukupna toksičnost MTX ($p < 0,0001$) u odnosu na pojedinačne cikluse u protokolu M, što je predstavljeno na Grafikonu 18.



Grafikon 18. Distribucija ispitanika u odnosu na ukupnu toksičnost MTX prema različitim doznim režimima

Kod ponavljanih ekspozicija MTX, dokazano je da je stariji uzrast statistički značajno češće ($p = 0,041$) ispoljio ukupnu toksičnost, sa prosekom od 10 godina, što je prikazano na Grafikonu 19. Poslednji (četvrti) ciklus MTX je korelirao sa povećanom toksičnošću u ovoj uzrastnoj grupi.



Grafikon 19. Korelacija prose nog uzrasta u odnosu na toksi nost ponavljanih ciklusa MTX

4.9. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa ukupnom toksi noš u MTX

Ukupna toksi nost je upore ena sa prisustvom varijanti u ispitivanim genima i nije vi ena statisti ka zna ajnost, što je predstavljeno u Tabeli 13. Kada je ukupna toksi nosti podeljena na klini ku i laboratorijsku, tako e nije vi ena korelacija sa varijantama u ispitivanim genima (Tabela 14 i Tabela 15).

Me utim, kada su se detektovani polimorfizmi uporedili sa razli itim doznim režimom MTX, pokazano je da se tokom primene protokola mM izdvojila varijanta c.677 T/T u genu za *MTHFR* koja je imala protektivni karakter. Naime, deca sa tim polimorfizmom su zna ajno re e ispoljila neželjene efekte terapije ($p=0,041$) u odnosu na drugu varijantu u istom genu, kao i na varijante u ostalim ispitivanim genima, što je predstavljeno u Tabeli 16.

Tokom prvog ciklusa MTX (1. M) u protokolu M nije vi ena korelacija ispitanih polimorfizama sa pojavom toksi nosti (Tabela 17), me utim tokom primene 2. M je vi ena asocijacija gena *SLC19A1* sa ispoljenom toksi noš u: varijanta c.80 G/G je pokazala protektivan karakter, dok su deca sa varijantom c.80 A/A zna ajno eš e ispoljila neželjene efekte MTX ($p=0,028$), što je pokazano u Tabeli 18. Istraženi

polimorfizmi nisu značajno uočeni u ispoljavanju toksičnosti tokom ciklusa 3. M (Tabela 19) i 4. M u protokolu M (Tabela 20).

Tabela 13. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa ukupnom toksičnošću u MTX

Polimorfizmi		Ukupna toksičnost		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Da	Ne		
TYMS 6bp	I/I	46 (65,7%)	24 (34,3%)	70 (100%)	0,190
	I/D	43 (70,5%)	18 (29,5%)	61 (100%)	
	D/D	15 (88,2%)	2 (11,8%)	17 (100%)	
Ukupno		104 (70,3%)	44 (29,7%)	148 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	37 (74%)	13 (26%)	50 (100%)	0,210
	3/2	39 (62,9%)	23 (37,1%)	62 (100%)	
	2/2	29 (78,4%)	8 (21,6%)	37 (100%)	
Ukupno		105 (70,5%)	44 (29,5%)	149 (100%)	
MTHFR 677	C/C	50 (71,4%)	20 (28,6%)	70 (100%)	0,069
	C/T	47 (75,8%)	15 (24,2%)	62 (100%)	
	T/T	8 (47,1%)	9 (52,9%)	17 (100%)	
Ukupno		105 (70,5%)	44 (29,5%)	149 (100%)	
MTHFR 1208	A/A	47 (66,2%)	24 (33,8%)	71 (100%)	0,109
	A/C	45 (78,9%)	12 (21,1%)	57 (100%)	
	C/C	10 (55,6%)	8 (44,4%)	18 (100%)	
Ukupno		102 (69,9%)	44 (30,1%)	146 (100%)	
RFC 80	G/G	28 (70%)	12 (30%)	40 (100%)	0,738
	G/A	45 (70%)	22 (32,8%)	67 (100%)	
	A/A	29 (74,4%)	10 (25,6%)	39 (100%)	
Ukupno		102 (69,9%)	44 (30,1%)	146 (100%)	
DHFR 680	A/A	7 (46,7%)	8 (53,3%)	15 (100%)	0,072
	C/A	49 (76,6%)	15 (23,4%)	64 (100%)	
	C/C	43 (68,3%)	20 (31,7%)	63 (100%)	
Ukupno		99 (69,7%)	43 (30,3%)	142 (100%)	
DHFR 675	A/A	52 (69,3%)	23 (30,7%)	75 (100%)	0,835
	A/G	37 (68,5%)	17 (31,5%)	54 (100%)	
	G/G	10 (76,9%)	3 (23,1%)	13 (100%)	
Ukupno		99 (69,7%)	43 (30,3%)	142 (100%)	
DHFR 556	T/T	51 (68,9%)	23 (31,1%)	74 (100%)	0,838
	T/C	38 (69,1%)	17 (30,9%)	55 (100%)	
	C/C	10 (76,9%)	3 (23,1%)	13 (100%)	
Ukupno		99 (69,7%)	43 (30,3%)	142 (100%)	
DHFR 464	A/A	51 (69,9%)	22 (30,1%)	73 (100%)	0,814
	A/T	38 (67,9%)	18 (32,1%)	56 (100%)	
	T/T	10 (76,9%)	3 (23,1%)	13 (100%)	
Ukupno		99 (69,7%)	43 (30,3%)	142 (100%)	
DHFR 317	A/A	36 (73,5%)	13 (26,5%)	49 (100%)	0,237
	A/G	51 (71,8%)	20 (28,2%)	71 (100%)	
	G/G	12 (54,5%)	10 (45,5%)	22 (100%)	
Ukupno		99 (69,7%)	43 (30,3%)	142 (100%)	

Tabela 14. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa klini kom toksi noš u MTX

Polimorfizmi		Klinička toksičnost		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Da	Ne		
TYMS 6bp	I/I	32 (45,7%)	38 (54,3%)	70 (100%)	0,343
	I/D	22 (36,1%)	39 (63,9%)	61 (100%)	
	D/D	5 (29,4%)	12 (70,6%)	17 (100%)	
Ukupno		59 (39,9%)	89 (60,1%)	148 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	20 (40%)	30 (60%)	50 (100%)	0,548
	3/2	27 (43,5%)	35 (56,5%)	62 (100%)	
	2/2	12 (32,4%)	25 (67,6%)	37 (100%)	
Ukupno		59 (39,6%)	90 (60,4%)	149 (100%)	
MTHFR 677	C/C	28 (40%)	42 (60%)	70 (100%)	0,426
	C/T	22 (35,5%)	40 (64,5%)	62 (100%)	
	T/T	9 (52,9%)	8 (47,1%)	17 (100%)	
Ukupno		59 (39,6%)	90 (60,4%)	149 (100%)	
MTHFR 1208	A/A	30 (42,3%)	41 (57,7%)	71 (100%)	0,228
	A/C	19 (33,3%)	38 (66,7%)	57 (100%)	
	C/C	10 (55,6%)	8 (44,4%)	18 (100%)	
Ukupno		59 (40,4%)	87 (59,6%)	146 (100%)	
RFC 80	G/G	18 (45%)	22 (55%)	40 (100%)	0,577
	G/A	24 (35,8%)	43 (64,2%)	67 (100%)	
	A/A	17 (43,6%)	22 (56,4%)	39 (100%)	
Ukupno		59 (40,4%)	87 (59,6%)	146 (100%)	
DHFR 680	A/A	8 (53,3%)	7 (46,7%)	15 (100%)	0,451
	C/A	23 (35,9%)	41 (64,1%)	64 (100%)	
	C/C	26 (41,3%)	37 (58,7%)	63 (100%)	
Ukupno		57 (40,1%)	85 (59,9%)	142 (100%)	
DHFR 675	A/A	30 (40%)	45 (60%)	75 (100%)	0,891
	A/G	21 (38,9%)	33 (61,1%)	54 (100%)	
	G/G	6 (46,2%)	7 (53,8%)	13 (100%)	
Ukupno		57 (40,1%)	85 (59,9%)	142 (100%)	
DHFR 556	T/T	29 (39,2%)	45 (60,8%)	74 (100%)	0,894
	T/C	22 (40%)	33 (60%)	55 (100%)	
	C/C	6 (46,2%)	7 (53,8%)	13 (100%)	
Ukupno		57 (40,1%)	85 (59,9%)	142 (100%)	
DHFR 464	A/A	28 (38,4%)	45 (61,6%)	73 (100%)	0,855
	A/T	23 (41,1%)	33 (58,9%)	56 (100%)	
	T/T	6 (46,2%)	7 (53,8%)	13 (100%)	
Ukupno		57 (40,1%)	85 (59,9%)	142 (100%)	
DHFR 317	A/A	18 (36,7%)	31 (63,3%)	49 (100%)	0,565
	A/G	28 (39,4%)	43 (60,6%)	71 (100%)	
	G/G	11 (50%)	11 (50%)	22 (100%)	
Ukupno		57 (40,1%)	85 (59,9%)	142 (100%)	

Tabela 15. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa laboratorijskom toksi noš u MTX

Polimorfizmi		Laboratorijska toksičnost		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Da	Ne		
TYMS 6bp	I/I	51 (72,9%)	19 (27,1)	70 (100%)	0,219
	I/D	45 (73,8%)	16 (26,2%)	61 (100%)	
	D/D	9 (52,9%)	8 (47,1%)	17 (100%)	
Ukupno		105 (70,9%)	43 (29,1%)	148 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	34 (68%)	16 (32%)	50 (100%)	0,569
	3/2	47 (75,8%)	15 (24,2%)	62 (100%)	
	2/2	25 (67,6%)	12 (32,4%)	37 (100%)	
Ukupno		106 (71,1%)	43 (28,9%)	149 (100%)	
MTHFR 677	C/C	50 (71,4%)	20 (28,6%)	70 (100%)	0,204
	C/T	41 (66,1%)	21 (33,9%)	62 (100%)	
	T/T	15 (88,2%)	2 (11,8%)	17 (100%)	
Ukupno		106 (71,1%)	43 (28,9%)	149 (100%)	
MTHFR 1208	A/A	52 (73,2%)	19 (26,8%)	71 (100%)	0,838
	A/C	40 (70,2%)	17 (29,8%)	57 (100%)	
	C/C	12 (66,7%)	6 (33,3%)	18 (100%)	
Ukupno		104 (71,2%)	42 (28,8%)	146 (100%)	
RFC 80	G/G	27 (67,5%)	13 (32,5%)	40 (100%)	0,484
	G/A	51 (76,1%)	16 (23,9%)	67 (100%)	
	A/A	26 (66,7%)	13 (33,3%)	39 (100%)	
Ukupno		104 (71,2%)	42 (28,8%)	146 (100%)	
DHFR 680	A/A	12 (80%)	3 (20%)	15 (100%)	0,493
	C/A	43 (67,2%)	21 (32,8%)	64 (100%)	
	C/C	47 (74,6%)	16 (25,4%)	63 (100%)	
Ukupno		102 (71,8%)	40 (28,2%)	142 (100%)	
DHFR 675	A/A	53 (70,7%)	22 (29,3%)	75 (100%)	0,895
	A/G	39 (72,2%)	15 (27,8%)	54 (100%)	
	G/G	10 (76,9%)	3 (23,1%)	13 (100%)	
Ukupno		102 (71,8%)	40 (28,2%)	142 (100%)	
DHFR 556	T/T	52 (70,3%)	22 (29,7%)	74 (100%)	0,870
	T/C	40 (72,7%)	15 (27,3%)	55 (100%)	
	C/C	10 (76,9%)	3 (23,1%)	13 (100%)	
Ukupno		102 (71,8%)	40 (28,2%)	142 (100%)	
DHFR 464	A/A	51 (69,9%)	22 (30,1%)	73 (100%)	0,836
	A/T	41 (73,2%)	15 (26,8%)	56 (100%)	
	T/T	10 (76,9%)	3 (23,1%)	13 (100%)	
Ukupno		102 (71,8%)	40 (28,2%)	142 (100%)	
DHFR 317	A/A	37 (75,5%)	12 (24,5%)	49 (100%)	0,528
	A/G	48 (67,6%)	23 (32,4%)	71 (100%)	
	G/G	17 (77,3%)	5 (22,7%)	22 (100%)	
Ukupno		102 (71,8%)	40 (28,2%)	142 (100%)	

Tabela 16. Korelacija ukupne toksičnosti i ispitivanih polimorfizama tokom primene protokola mM

Polimorfizmi		mM – ukupna toksičnost		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Da	Ne		
TYMS 6bp	I/I	28 (59,6%)	19 (40,4%)	47 (100%)	0,543
	I/D	31 (66%)	16 (34%)	47 (100%)	
	D/D	7 (77,8%)	2 (22,2%)	9 (100%)	
Ukupno		66 (64,1%)	37 (35,9%)	103 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	25 (65,8%)	13 (34,2%)	38 (100%)	0,424
	3/2	23 (57,5%)	17 (42,5%)	40 (100%)	
	2/2	19 (73,1%)	7 (26,9%)	26 (100%)	
Ukupno		67 (64,4%)	37 (35,6%)	104 (100%)	
MTHFR 677	C/C	31 (64,6%)	17 (35,4%)	48 (100%)	0,041
	C/T	32 (72,7%)	12 (27,3%)	44 (100%)	
	T/T	4 (33,3%)	8 (66,7%)	12 (100%)	
Ukupno		67 (64,4%)	37 (35,6%)	104 (100%)	
MTHFR 1208	A/A	28 (57,1%)	21 (42,9%)	49 (100%)	0,292
	A/C	31 (72,1%)	12 (27,9%)	43 (100%)	
	C/C	5 (55,6%)	4 (44,4%)	9 (100%)	
Ukupno		64 (63,4%)	37 (36,9%)	101 (100%)	
RFC 80	G/G	19 (65,5%)	10 (34,5%)	29 (100%)	0,723
	G/A	26 (59,1%)	18 (40,9%)	44 (100%)	
	A/A	19 (67,9%)	9 (32,1%)	28 (100%)	
Ukupno		64 (63,4%)	37 (36,6%)	101 (100%)	
DHFR 680	A/A	6 (50%)	6 (50%)	12 (100%)	0,192
	C/A	35 (72,9%)	13 (27,1%)	48 (100%)	
	C/C	22 (57,9%)	16 (42,1%)	38 (100%)	
Ukupno		63 (64,3%)	35 (35,7%)	98 (100%)	
DHFR 675	A/A	36 (65,5%)	19 (34,5%)	55 (100%)	0,831
	A/G	20 (60,6%)	13 (39,4%)	33 (100%)	
	G/G	7 (70%)	3 (30%)	10 (100%)	
Ukupno		63 (64,3%)	35 (35,7%)	98 (100%)	
DHFR 556	T/T	36 (65,5%)	19 (34,5%)	55 (100%)	0,831
	T/C	20 (60,6%)	13 (39,4%)	33 (100%)	
	C/C	7 (70%)	3 (30%)	10 (100%)	
Ukupno		63 (64,3%)	35 (35,7%)	98 (100%)	
DHFR 464	A/A	36 (66,7%)	18 (33,3%)	54 (100%)	0,699
	A/T	20 (58,8%)	14 (41,2%)	34 (100%)	
	T/T	7 (70%)	3 (30%)	10 (100%)	
Ukupno		63 (64,3%)	35 (35,7%)	98 (100%)	
DHFR 317	A/A	19 (65,5%)	10 (34,5%)	29 (100%)	0,417
	A/G	36 (67,9%)	17 (32,1%)	53 (100%)	
	G/G	8 (50%)	8 (50%)	16 (100%)	
Ukupno		63 (64,3%)	35 (35,7%)	98 (100%)	

Tabela 17. Korelacija ukupne toksičnosti i ispitivanih polimorfizama tokom primene 1. M ciklusa u protokolu M

Polimorfizmi		1. M – ukupna toksičnost		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Da	Ne		
TYMS 6bp	I/I	5 (33,3%)	10 (66,7%)	15 (100%)	0,259
	I/D	4 (50%)	4 (50%)	8 (100%)	
	D/D	3 (60%)	2 (40%)	5 (100%)	
Ukupno		12 (42,9%)	16 (57,1%)	28 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	4 (66,7%)	2 (33,3%)	6 (100%)	0,960
	3/2	3 (23,1%)	10 (76,9%)	13 (100%)	
	2/2	5 (55,6%)	4 (44,4%)	9 (100%)	
Ukupno		12 (42,9%)	16 (57,1%)	28 (100%)	
MTHFR 677	C/C	5 (38,5%)	8 (61,5%)	13 (100%)	0,798
	C/T	6 (50%)	6 (50%)	12 (100%)	
	T/T	1 (33,3%)	2 (66,7%)	3 (100%)	
Ukupno		12 (42,9%)	16 (57,1%)	28 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	7 (50%)	7 (50%)	14 (100%)	0,448
	A/C	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8 (100%)	
	C/C	2 (33,3%)	4 (66,7%)	6 (100%)	
Ukupno		12 (42,9%)	16 (57,1%)	28 (100%)	
SLC19A1	G/G	1 (14,3%)	6 (85,7%)	7 (100%)	0,112
	G/A	7 (50%)	7 (50%)	14 (100%)	
	A/A	4 (57,1%)	3 (42,9%)	7 (100%)	
Ukupno		12 (42,9%)	16 (57,1%)	28 (100%)	
DHFR 680	A/A	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	0,458
	C/A	3 (30%)	7 (70%)	10 (100%)	
	C/C	8 (50%)	8 (50%)	16 (100%)	
Ukupno		12 (42,9%)	16 (57,1%)	28 (100%)	
DHFR 675	A/A	4 (30,8%)	9 (69,2%)	13 (100%)	0,468
	A/G	8 (61,5%)	5 (38,5%)	13 (100%)	
	G/G	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	
Ukupno		12 (42,9%)	16 (57,1%)	28 (100%)	
DHFR 556	T/T	4 (33,3%)	8 (66,7%)	12 (100%)	0,677
	T/C	8 (57,1%)	6 (42,9%)	14 (100%)	
	C/C	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	
Ukupno		12 (42,9%)	16 (57,1%)	28 (100%)	
DHFR 464	A/A	4 (33,3%)	8 (66,7%)	12 (100%)	0,677
	A/T	8 (57,1%)	6 (42,9%)	14 (100%)	
	T/T	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	
Ukupno		12 (42,9%)	16 (57,1%)	28 (100%)	
DHFR 317	A/A	5 (41,7%)	7 (58,3%)	12 (100%)	0,701
	A/G	5 (38,5%)	8 (61,5%)	13 (100%)	
	G/G	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Ukupno		12 (42,9%)	16 (57,1%)	28 (100%)	

Tabela 18. Korelacija ukupne toksičnosti i ispitivanih polimorfizama tokom primene 2. M ciklusa u protokolu M

Polimorfizmi		2. M – ukupna toksičnost		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Da	Ne		
TYMS 6bp	I/I	9 (60%)	6 (40%)	15 (100%)	0,508
	I/D	5 (62,5%)	3 (37,5%)	8 (100%)	
	D/D	4 (80%)	1 (20%)	5 (100%)	
Ukupno		18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	3 (50%)	3 (50%)	6 (100%)	0,587
	3/2	9 (69,2%)	4 (30,8%)	13 (100%)	
	2/2	6 (66,7%)	3 (33,3%)	9 (100%)	
Ukupno		18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (100%)	
MTHFR 677	C/C	8 (61,5%)	5 (38,5%)	13 (100%)	0,791
	C/T	8 (66,7%)	4 (33,3%)	12 (100%)	
	T/T	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Ukupno		18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	10 (71,4%)	4 (28,6%)	14 (100%)	0,602
	A/C	4 (50%)	4 (50%)	8 (100%)	
	C/C	4 (66,7%)	2 (33,3%)	6 (100%)	
Ukupno		18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (100%)	
SLC19A1	G/G	2 (28,6%)	5 (71,4%)	7 (100%)	0,028
	G/A	10 (71,4%)	4 (28,6%)	14 (100%)	
	A/A	6 (85,7%)	1 (14,3%)	7 (100%)	
Ukupno		18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (100%)	
DHFR 680	A/A	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	0,547
	C/A	6 (60%)	4 (40%)	10 (100%)	
	C/C	11 (68,8%)	5 (31,2%)	16 (100%)	
Ukupno		18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (100%)	
DHFR 675	A/A	8 (61,5%)	5 (38,5%)	13 (100%)	0,893
	A/G	9 (69,2%)	4 (30,8%)	13 (100%)	
	G/G	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	
Ukupno		18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (100%)	
DHFR 556	T/T	8 (66,7%)	4 (33,3%)	12 (100%)	0,747
	T/C	9 (64,3%)	5 (35,7%)	14 (100%)	
	C/C	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	
Ukupno		18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (100%)	
DHFR 464	A/A	8 (66,7%)	4 (33,3%)	12 (100%)	0,747
	A/T	9 (64,3%)	5 (35,7%)	14 (100%)	
	T/T	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	
Ukupno		18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (100%)	
DHFR 317	A/A	8 (66,7%)	4 (33,3%)	12 (100%)	0,874
	A/G	8 (61,5%)	5 (38,5%)	13 (100%)	
	G/G	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Ukupno		18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (100%)	

Tabela 19. Korelacija ukupne toksičnosti i ispitivanih polimorfizama tokom primene 3. M ciklusa u protokolu M

Polimorfizmi		3. M – ukupna toksičnost		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Da	Ne		
TYMS 6bp	I/I	7 (46,7%)	8 (53,3%)	15 (100%)	0,247
	I/D	5 (55,6%)	4 (44,4%)	9 (100%)	
	D/D	4 (80%)	1 (20%)	5 (100%)	
Ukupno		16 (55,2%)	13 (44,8%)	29 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6 (100%)	0,432
	3/2	6 (42,9%)	8 (57,1%)	14 (100%)	
	2/2	5 (55,6%)	4 (44,4%)	9 (100%)	
Ukupno		16 (55,2%)	13 (44,8%)	29 (100%)	
MTHFR 677	C/C	7 (50%)	7 (50%)	14 (100%)	0,560
	C/T	7 (58,3%)	5 (41,7%)	12 (100%)	
	T/T	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Ukupno		16 (55,2%)	13 (44,8%)	29 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	10 (66,7%)	5 (33,3%)	15 (100%)	0,290
	A/C	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8 (100%)	
	C/C	3 (50%)	3 (50%)	6 (100%)	
Ukupno		16 (55,2%)	13 (44,8%)	29 (100%)	
SLCA19A	G/G	4 (57,1%)	3 (42,9%)	7 (100%)	0,597
	G/A	9 (60%)	6 (40%)	15 (100%)	
	A/A	3 (42,9%)	4 (57,1%)	7 (100%)	
Ukupno		16 (55,2%)	13 (44,8%)	29 (100%)	
DHFR 680	A/A	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	0,412
	C/A	5 (45,5%)	6 (54,5%)	11 (100%)	
	C/C	10 (62,5%)	6 (37,5%)	16 (100%)	
Ukupno		16 (55,2%)	13 (44,8%)	29 (100%)	
DHFR 675	A/A	8 (57,1%)	6 (42,9%)	14 (100%)	0,825
	A/G	7 (53,8%)	6 (46,2%)	13 (100%)	
	G/G	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	
Ukupno		16 (55,2%)	13 (44,8%)	29 (100%)	
DHFR 556	T/T	8 (61,5%)	5 (38,5%)	13 (100%)	0,556
	T/C	7 (50%)	7 (50%)	14 (100%)	
	C/C	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	
Ukupno		16 (55,2%)	13 (44,8%)	29 (100%)	
DHFR 464	A/A	8 (61,5%)	5 (38,5%)	13 (100%)	0,556
	A/T	7 (50%)	7 (50%)	14 (100%)	
	T/T	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	
Ukupno		16 (55,2%)	13 (44,8%)	29 (100%)	
DHFR 317	A/A	6 (50%)	6 (50%)	12 (100%)	0,774
	A/G	8 (61,5%)	5 (38,5%)	13 (100%)	
	G/G	2 (50%)	2 (50%)	4 (100%)	
Ukupno		16 (55,2%)	13 (44,8%)	29 (100%)	

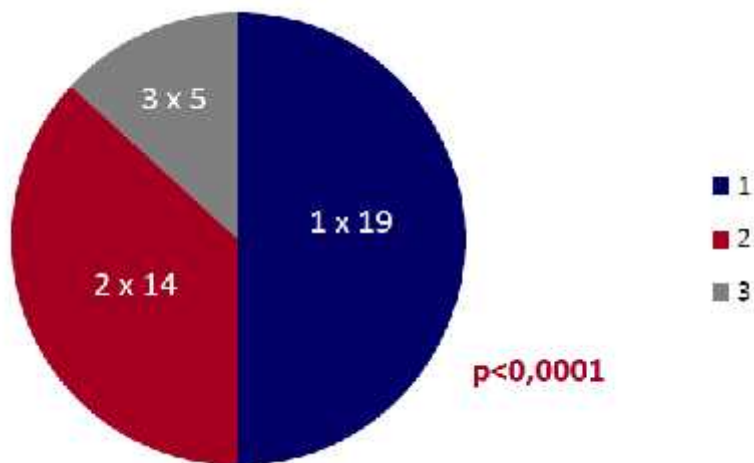
Tabela 20. Korelacija ukupne toksičnosti i ispitivanih polimorfizama tokom primene 4. M ciklusa u protokolu M

Polimorfizmi		4. M – ukupna toksičnost		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Da	Ne		
TYMS 6bp	I/I	6 (40%)	9 (60%)	15 (100%)	0,362
	I/D	5 (55,6%)	4 (44,4%)	9 (100%)	
	D/D	3 (60%)	2 (40%)	5 (100%)	
Ukupno		14 (48,3%)	15 (51,7%)	29 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	4 (66,7%)	2 (33,3%)	6 (100%)	0,868
	3/2	5 (35,7%)	9 (64,3%)	14 (100%)	
	2/2	5 (55,6%)	4 (44,4%)	9 (100%)	
Ukupno		14 (48,3%)	15 (51,7%)	29 (100%)	
MTHFR 677	C/C	7 (50%)	7 (50%)	14 (100%)	0,754
	C/T	6 (50%)	6 (50%)	12 (100%)	
	T/T	1 (33,3%)	2 (66,7%)	3 (100%)	
Ukupno		14 (48,3%)	15 (51,7%)	29 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	8 (53,3%)	7 (46,7%)	15 (100%)	0,702
	A/C	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8 (100%)	
	C/C	3 (50%)	3 (50%)	6 (100%)	
Ukupno		14 (48,3%)	15 (51,7%)	29 (100%)	
SLCA19A	G/G	2 (28,6%)	5 (71,4%)	7 (100%)	0,115
	G/A	7 (46,7%)	8 (53,3%)	15 (100%)	
	A/A	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7 (100%)	
Ukupno		14 (48,3%)	15 (51,7%)	29 (100%)	
DHFR 680	A/A	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	0,863
	C/A	5 (45,5%)	6 (54,5%)	11 (100%)	
	C/C	8 (50%)	8 (50%)	16 (100%)	
Ukupno		14 (48,3%)	15 (51,7%)	29 (100%)	
DHFR 675	A/A	5 (35,7%)	9 (64,3%)	14 (100%)	0,420
	A/G	9 (69,2%)	4 (30,8%)	13 (100%)	
	G/G	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	
Ukupno		14 (48,3%)	15 (51,7%)	29 (100%)	
DHFR 556	T/T	5 (38,5%)	8 (61,5%)	13 (100%)	0,643
	T/C	9 (64,3%)	5 (35,7%)	14 (100%)	
	C/C	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	
Ukupno		14 (48,3%)	15 (51,7%)	29 (100%)	
DHFR 464	A/A	5 (38,5%)	8 (61,5%)	13 (100%)	0,643
	A/T	9 (64,3%)	5 (35,7%)	14 (100%)	
	T/T	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	
Ukupno		14 (48,3%)	15 (51,7%)	29 (100%)	
DHFR 317	A/A	5 (41,7%)	7 (58,3%)	12 (100%)	0,617
	A/G	7 (53,8%)	6 (46,2%)	13 (100%)	
	G/G	2 (50%)	2 (50%)	4 (100%)	
Ukupno		14 (48,3%)	15 (51,7%)	29 (100%)	

4.10. Distribucija pacijenata u odnosu na farmakokinetiku metotreksata

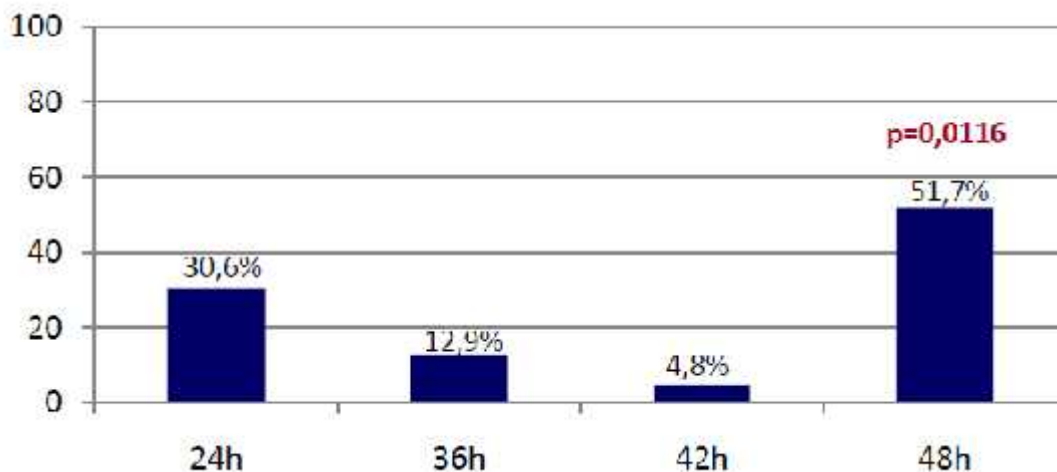
Kao što je već u uvodu i poglavlju materijala i metoda navedeno, ispitanici u ovoj studiji su primali različite dozne režime MTX: 2 g/m² i 5 g/m². Farmakokinetika je merena samo u deca kojima je ordinirana veća doza leka.

Najveći broj dece ($p < 0,0001$) je ispoljio jednu epizodu usporenja kinetike leka tokom faze konsolidacije, nešto manji broj dece dve i najmanji broj dece tri epizode. Nijedno dete nije imalo produženu PK u svim četiri primenjena ciklusa MTX. Distribucija produžene PK je predstavljena na Grafikonu 20.



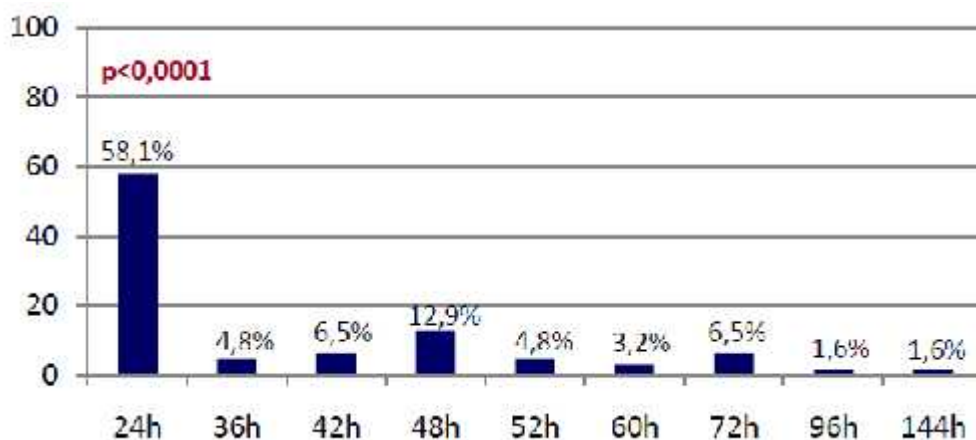
Grafikon 20. Distribucija ispitanika u odnosu na broj ciklusa produžene PK MTX

Primenjena PK MTX je ukazala da se statistički značajno usporeenje eliminacije leka ($p = 0,0116$) registruje 48h od početka primene u više od polovine ispitanika (51,7%). Po ustalosti sledi 24h (30,6%) i značajno ređe 36h i 42h. Distribucija ispitanika u odnosu na vreme javljanja produžene kinetike MTX je predstavljena na Grafikonu 21.



Grafikon 21. Distribucija ispitanika u odnosu vreme javljanja produžene kinetike MTX

Produžena kinetika je pra ena do momenta kada nivo leka dostigne bezbednu koncentraciju u krvi. Najve i broj dece (58,1%) je imao kratkotrajno produženu ekskreciju leka, u trajanju od 24h ($p<0,0001$), mada su mereni produženi nivoi i do 144h sata od po etka primene MTX. Distribucija ispitanika u odnosu na trajanje PK MTX je pokazana na Grafikonu 22.



Grafikon 22. Distribucija ispitanika u odnosu na trajanje produženih nivoa MTX

4.11. Korelacija polimorfizama u ispitanim genima i PK MTX

Kada se posmatraju svi ciklusi MTX zbirno, izdvaja se varijanta 6bp D/D u genu za *TYMS* koja korelira sa povišenim nivoima MTX ($p=0,046$), što je prikazano u Tabeli 21. Međutim, kada se posmatraju pojedinačni ciklusi MTX, primećeno je da drugi polimorfizmi koreliraju sa produženom kinetikom leka. Tokom primene 1. M su se izdvojile varijante c.1298 A/C i c.1298 C/C u genu za *MTHFR* kod kojih je bila neadekvatna ekskrecija MTX ($p=0,046$), što je prikazano u Tabeli 22. U toku primene 2. MTX nijedan polimorfizam nije korelirao sa poremećajem u PK MTX (Tabela 23). U toku 3. M se ponovo primećuje produžena kinetika leka kod varijante 6bp D/D u genu za *TYMS* ($p=0,003$), kao i kod varijanti -675 ($p=0,008$), -556 ($p=0,013$) i -464 ($p=0,013$) u genu za *DHFR*, što je predstavljeno u Tabeli 24. U poslednjem, četvrtom ciklusu nijedan polimorfizam nije korelirao sa ispoljenom toksičnošću (Tabela 25).

Tabela 21. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa PK MTX

Polimorfizmi		Nivo MTX		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Povišen	Nije povišen		
TYMS 6 bp	I/I	10 (43,5%)	13 (56,5%)	23 (100%)	0,046
	I/D	10 (62,5%)	6 (37,5%)	16 (100%)	
	D/D	6 (85,7%)	1 (14,3%)	7 (100%)	
Ukupno		26 (56,5%)	20 (43,5%)	46 (100%)	
TYMS 28 bp	3/3	5 (45,5%)	6 (54,5%)	11 (100%)	0,690
	3/2	14 (60,9%)	9 (39,1%)	23 (100%)	
	2/2	7 (58,3%)	5 (41,7%)	12 (100%)	
Ukupno		26 (56,5%)	20 (43,5%)	46 (100%)	
MTHFR 677	C/C	14 (58,3%)	10 (41,7%)	24 (100%)	0,863
	C/T	9 (52,9%)	8 (47,1%)	17 (100%)	
	T/T	3 (60%)	2 (40%)	5 (100%)	
Ukupno		26 (56,5%)	20 (43,5%)	46 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	11 (50%)	11 (50%)	22 (100%)	0,350
	A/C	8 (53,3%)	7 (46,7%)	15 (100%)	
	C/C	7 (77,8%)	2 (22,2%)	5 (100%)	
Ukupno		26 (56,5%)	20 (43,5%)	46 (100%)	
SLC19A1	G/G	5 (41,7%)	7 (58,3%)	12 (100%)	0,477
	G/A	14 (60,9%)	9 (39,1%)	23 (100%)	
	A/A	7 (63,6%)	4 (36,4%)	11 (100%)	
Ukupno		26 (56,5%)	20 (43,5%)	46 (100%)	
DHFR 680	A/A	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)	0,566
	C/A	9 (52,9%)	8 (47,1%)	17 (100%)	
	C/C	14 (56%)	11 (44%)	25 (100%)	
Ukupno		26 (57,8%)	19 (42,2%)	45 (100%)	
DHFR 675	A/A	11 (50%)	11 (50%)	22 (100%)	0,193
	A/G	12 (60%)	8 (40%)	20 (100%)	
	G/G	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)	
Ukupno		26 (57,8%)	19 (42,2%)	45 (100%)	
DHFR 556	T/T	11 (52,4%)	10 (47,6%)	21 (100%)	0,315
	T/C	12 (57,1%)	9 (42,9%)	21 (100%)	
	C/C	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)	
Ukupno		26 (57,8%)	19 (42,2%)	45 (100%)	
DHFR 464	A/A	11 (52,4%)	10 (47,6%)	21 (100%)	0,315
	A/T	12 (57,1%)	9 (42,9%)	21 (100%)	
	T/T	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)	
Ukupno		26 (57,8%)	19 (42,2%)	45 (100%)	
DHFR 317	A/A	13 (68,4%)	6 (31,6%)	19 (100%)	0,624
	A/G	8 (40%)	12 (60%)	20 (100%)	
	G/G	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6 (100%)	
Ukupno		26 (57,8%)	19 (42,2%)	45 (100%)	

Tabela 22. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa PK tokom primene 1. M

Polimorfizmi		Nivoi 1. MTX					Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Nije povišen	24h	32h	42h	48h		
TYMS 6bp	I/I	18 (78,3%)	0 (0%)	1 (4,3%)	1 (4,3%)	3 (13%)	23 (100%)	0,726
	I/D	11 (68,8%)	1 (6,2%)	1 (6,2%)	0 (0%)	3 (18,8%)	16 (100%)	
	D/D	5 (71,4%)	0 (0%)	1 (14,3%)	0 (0%)	1 (14,3%)	7 (100%)	
Ukupno		34 (73,9%)	1 (2,2%)	3 (6,5%)	1 (2,2%)	7 (15,2%)	46 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	8 (72,7%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	0 (0%)	1 (9,1%)	11 (100%)	0,695
	3/2	17 (73,9%)	0 (0%)	1 (4,3%)	1 (4,3%)	4 (17,4%)	23 (100%)	
	2/2	9 (75%)	0 (0%)	1 (8,3%)	0 (0%)	2 (16,7%)	12 (100%)	
Ukupno		34 (73,9%)	1 (2,2%)	3 (6,5%)	1 (2,2%)	7 (15,2%)	46 (100%)	
MTHFR 677	C/C	16 (66,7%)	0 (0%)	3 (12,5%)	1 (4,2%)	4 (16,7%)	24 (100%)	0,370
	C/T	14 (82,4%)	1 (5,9%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (11,8%)	17 (100%)	
	T/T	4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	5 (100%)	
Ukupno		34 (73,9%)	1 (2,2%)	3 (6,5%)	1 (2,2%)	7 (15,2%)	46 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	19 (86,4%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)	0 (0%)	1 (4,5%)	22 (100%)	0,041
	A/C	12 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (20%)	15 (100%)	
	C/C	3 (33,3%)	0 (0%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	3 (33,3%)	9 (100%)	
Ukupno		34 (73,9%)	1 (2,2%)	3 (6,5%)	1 (2,2%)	7 (15,2%)	46 (100%)	
SLC 19A1	G/G	11 (91,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8,3%)	12 (100%)	0,839
	G/A	15 (65,2%)	1 (4,3%)	2 (8,7%)	1 (4,3%)	4 (17,4%)	23 (100%)	
	A/A	8 (72,7%)	0 (0%)	1 (9,1%)	0 (0%)	2 (18,2%)	11 (100%)	
Ukupno		34 (73,9%)	1 (2,2%)	3 (6,5%)	1 (2,2%)	7 (15,2%)	46 (100%)	
DHFR 680	A/A	1 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66,7%)	3 (100%)	0,747
	C/A	15 (88,2%)	0 (0%)	1 (5,9%)	0 (0%)	1 (5,9%)	17 (100%)	
	C/C	17 (68%)	1 (4%)	2 (8%)	1 (4%)	4 (16%)	25 (100%)	
Ukupno		33 (73,3%)	1 (2,2%)	3 (6,7%)	1 (2,2%)	7 (15,6%)	45 (100%)	
DHFR 675	A/A	16 (72,7%)	0 (0%)	2 (9,1%)	0 (0%)	4 (18,2%)	22 (100%)	0,773
	A/G	15 (75%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)	2 (10%)	20 (100%)	
	G/G	2 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Ukupno		33 (73,3%)	1 (2,2%)	3 (6,7%)	1 (2,2%)	7 (15,6%)	45 (100%)	
DHFR 556	T/T	15 (71,4%)	0 (0%)	2 (9,5%)	0 (0%)	4 (19%)	21 (100%)	0,769
	T/C	16 (76,2%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	2 (9,5%)	21 (100%)	
	C/C	2 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Ukupno		33 (73,3%)	1 (2,2%)	3 (6,7%)	1 (2,2%)	7 (15,6%)	45 (100%)	
DHFR 464	A/A	15 (71,4%)	0 (0%)	2 (9,5%)	0 (0%)	4 (19%)	21 (100%)	0,769
	A/T	16 (76,2%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	2 (9,5%)	21 (100%)	
	T/T	2 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Ukupno		33 (73,3%)	1 (2,2%)	3 (6,7%)	1 (2,2%)	7 (15,6%)	45 (100%)	
DHFR 317	A/A	12 (63,2%)	1 (5,3%)	2 (10,5%)	1 (5,3%)	3 (15,8%)	19 (100%)	0,460
	A/G	17 (85%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	2 (10%)	20 (100%)	
	G/G	4 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33,3%)	6 (100%)	
Ukupno		33 (73,3%)	1 (2,2%)	3 (6,7%)	1 (2,2%)	7 (15,6%)	45 (100%)	

Tabela 23. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa PK tokom primene 2. M

Polimorfizmi		Nivoi 2. MTX					Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Nije povišen	24h	32h	42h	48h		
TYMS 6bp	I/I	15 (71,4%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	3 (14,3%)	21 (100%)	0,427
	I/D	10 (66,7%)	0 (0%)	1 (6,7%)	0 (0%)	4 (26,7%)	15 (100%)	
	D/D	4 (57,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (42,9%)	7 (100%)	
Ukupno		29 (67,4%)	1 (2,3%)	2 (4,7%)	1 (2,3%)	10 (23,3%)	43 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)	10 (100%)	0,545
	3/2	15 (68,2%)	1 (4,5%)	2 (9,1%)	0 (0%)	4 (18,2%)	22 (100%)	
	2/2	6 (54,5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (9,1%)	4 (36,4%)	11 (100%)	
Ukupno		29 (67,4%)	1 (2,3%)	2 (4,7%)	1 (2,3%)	10 (23,3%)	43 (100%)	
MTHFR 677	C/C	15 (65,2%)	1 (4,3%)	2 (8,7%)	0 (0%)	5 (21,7%)	23 (100%)	0,257
	C/T	10 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (33,3%)	15 (100%)	
	T/T	4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	5 (100%)	
Ukupno		29 (67,4%)	1 (2,3%)	2 (4,7%)	1 (2,3%)	10 (23,3%)	43 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	16 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	3 (5%)	20 (100%)	0,332
	A/C	7 (50%)	0 (0%)	2 (14,3%)	0 (0%)	5 (35,7%)	14 (100%)	
	C/C	6 (66,7%)	1 (11,1%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (22,2%)	9 (100%)	
Ukupno		29 (67,4%)	1 (2,3%)	2 (4,7%)	1 (2,3%)	10 (23,3%)	43 (100%)	
SLC 19A1	G/G	8 (72,7%)	1 (9,1%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (18,2%)	11 (100%)	0,538
	G/A	14 (66,7%)	0 (0%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	5 (23,8%)	21 (100%)	
	A/A	7 (63,6%)	0 (0%)	1 (9,1%)	0 (0%)	3 (27,3%)	11 (100%)	
Ukupno		29 (67,4%)	1 (2,3%)	2 (4,7%)	1 (2,3%)	10 (23,3%)	43 (100%)	
DHFR 680	A/A	14 (66,7%)	1 (4,8%)	2 (9,5%)	0 (0%)	4 (19%)	21 (100%)	0,188
	C/A	12 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,6%)	5 (27,8%)	18 (100%)	
	C/C	2 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Ukupno		28 (66,7%)	1 (2,4%)	2 (4,8%)	1 (2,4%)	10 (23,8%)	42 (100%)	
DHFR 675	A/A	16 (72,7%)	0 (0%)	2 (9,1%)	0 (0%)	4 (18,2%)	22 (100%)	0,426
	A/G	15 (75%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)	2 (10%)	20 (100%)	
	G/G	2 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Ukupno		33 (73,3%)	1 (2,2%)	3 (6,7%)	1 (2,2%)	7 (15,6%)	45 (100%)	
DHFR 556	T/T	13 (65%)	1 (5%)	2 (10%)	0 (0%)	4 (20%)	20 (100%)	0,420
	T/C	13 (68,4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,3%)	5 (26,3%)	19 (100%)	
	C/C	2 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Ukupno		28 (66,7%)	1 (2,4%)	2 (4,8%)	1 (2,4%)	10 (23,8%)	42 (100%)	
DHFR 464	A/A	13 (65%)	1 (5%)	2 (10%)	0 (0%)	4 (20%)	20 (100%)	0,420
	A/T	13 (68,4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,3%)	5 (26,3%)	19 (100%)	
	T/T	2 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Ukupno		28 (66,7%)	1 (2,4%)	2 (4,8%)	1 (2,4%)	10 (23,8%)	42 (100%)	
DHFR 317	A/A	11 (64,7%)	0 (0%)	1 (0%)	1 (5,9%)	5 (29,4%)	17 (100%)	0,171
	A/G	14 (73,7%)	0 (0%)	1 (5,3%)	0 (0%)	4 (21,1%)	19 (100%)	
	G/G	3 (50%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	0 (0%)	1 (16,7%)	6 (100%)	
Ukupno		28 (66,7%)	1 (2,4%)	2 (4,8%)	1 (2,4%)	10 (23,8%)	42 (100%)	

Tabela 24. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa PK tokom primene 3. MTX

Polimorfizmi		Nivoi 3. MTX					Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Nije povišen	24h	32h	42h	48h		
TYMS 6bp	I/I	15 (88,2%)	/	/	/	2 (11,8%)	17 (100%)	0,003
	I/D	7 (70%)	/	/	/	3 (30%)	10 (100%)	
	D/D	1 (16,7%)	/	/	/	5 (83,3%)	6 (100%)	
Ukupno		23 (69,7%)	/	/	/	10 (30,3%)	33 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	3 (42,9%)	/	/	/	4 (57,1%)	7 (100%)	0,415
	3/2	14 (82,4%)	/	/	/	3 (17,6%)	17 (100%)	
	2/2	6 (66,7%)	/	/	/	3 (33,3%)	9 (100%)	
Ukupno		23 (69,7%)	/	/	/	10 (30,3%)	33 (100%)	
MTHFR 677	C/C	12 (70,6%)	/	/	/	5 (29,4%)	17 (100%)	0,983
	C/T	8 (66,7%)	/	/	/	4 (33,3%)	12 (100%)	
	T/T	3 (75%)	/	/	/	1 (25%)	4 (100%)	
Ukupno		23 (69,7%)	/	/	/	10 (30,3%)	33 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	11 (64,7%)	/	/	/	6 (35,3%)	17 (100%)	0,607
	A/C	7 (77,8%)	/	/	/	2 (22,2%)	9 (100%)	
	C/C	5 (71,4%)	/	/	/	2 (28,6%)	7 (100%)	
Ukupno		23 (69,7%)	/	/	/	10 (30,3%)	33 (100%)	
SLC 19A1	G/G	6 (66,7%)	/	/	/	3 (33,3%)	9 (100%)	0,882
	G/A	12 (75%)	/	/	/	4 (25%)	16 (100%)	
	A/A	5 (62,5%)	/	/	/	3 (37,5%)	8 (100%)	
Ukupno		23 (69,7%)	/	/	/	10 (30,3%)	33 (100%)	
DHFR 680	A/A	1 (50%)	/	/	/	1 (50%)	2 (100%)	0,807
	C/A	10 (76,9%)	/	/	/	3 (23,1%)	13 (100%)	
	C/C	12 (66,7%)	/	/	/	6 (33,3%)	18 (100%)	
Ukupno		23 (69,7%)	/	/	/	10 (30,3%)	33 (100%)	
DHFR 675	A/A	14 (87,5%)	/	/	/	4 (12,5%)	16 (100%)	0,008
	A/G	9 (64,3%)	/	/	/	5 (35,7%)	14 (100%)	
	G/G	0 (0%)	/	/	/	3 (100%)	3 (100%)	
Ukupno		23 (69,7%)	/	/	/	10 (30,3%)	33 (100%)	
DHFR 556	T/T	13 (86,7%)	/	/	/	2 (13,3%)	15 (100%)	0,013
	T/C	10 (66,7%)	/	/	/	5 (33,3%)	15 (100%)	
	C/C	0 (0%)	/	/	/	3 (100%)	3 (100%)	
Ukupno		23 (69,7%)	/	/	/	10 (30,3%)	33 (100%)	
DHFR 464	A/A	13 (86,7%)	/	/	/	2 (13,3%)	15 (100%)	0,013
	A/T	10 (66,7%)	/	/	/	5 (33,3%)	15 (100%)	
	T/T	0 (0%)	/	/	/	3 (100%)	3 (100%)	
Ukupno		23 (69,7%)	/	/	/	10 (30,3%)	33 (100%)	
DHFR 317	A/A	7 (53,8%)	/	/	/	6 (46,2%)	13 (100%)	0,342
	A/G	14 (87,5%)	/	/	/	2 (12,5%)	16 (100%)	
	G/G	2 (50%)	/	/	/	2 (50%)	4 (100%)	
Ukupno		23 (69,7%)	/	/	/	10 (30,3%)	33 (100%)	

Tabela 25. Korelacija polimorfizama u svim ispitivanim genima sa povišenim nivoima tokom primene 4. MTX

Polimorfizmi		Nivoi 4. MTX					Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Nije povišen	24h	32h	42h	48h		
TYMS 6bp	I/I	12 (80%)	/	1 (6,7%)	0 (0%)	2 (13,3%)	15 (100%)	0,908
	I/D	7 (77,8%)	/	0 (0%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	9 (100%)	
	D/D	4 (66,7%)	/	1 (16,7%)	0 (0%)	1 (16,7%)	6 (100%)	
Ukupno		23 (76,7%)	/	2 (6,7%)	1 (3,3%)	4 (13,3%)	30 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	7 (100%)	/	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)	0,465
	3/2	9 (64,3%)	/	1 (7,1%)	0 (0%)	4 (28,6%)	14 (100%)	
	2/2	7 (77,8%)	/	1 (11,1%)	1 (11,1%)	0 (0%)	9 (100%)	
Ukupno		23 (76,7%)	/	2 (6,7%)	1 (3,3%)	4 (13,3%)	30 (100%)	
MTHFR 677	C/C	11 (73,3%)	/	1 (6,7%)	1 (6,7%)	2 (13,3%)	15 (100%)	0,799
	C/T	10 (83,3%)	/	1 (8,3%)	0 (0%)	1 (8,3%)	12 (100%)	
	T/T	2 (66,7%)	/	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	3 (100%)	
Ukupno		23 (76,7%)	/	2 (6,7%)	1 (3,3%)	4 (13,3%)	30 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	11 (78,6%)	/	1 (7,1%)	0 (0%)	2 (14,3%)	14 (100%)	0,530
	A/C	8 (88,9%)	/	0 (0%)	0 (0%)	1 (11,1%)	9 (100%)	
	C/C	4 (57,1%)	/	1 (14,3%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)	7 (100%)	
Ukupno		23 (76,7%)	/	2 (6,7%)	1 (3,3%)	4 (13,3%)	30 (100%)	
SLC 19A1	G/G	9 (100%)	/	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (100%)	0,407
	G/A	9 (64,3%)	/	2 (14,3%)	1 (7,1%)	2 (14,3%)	14 (100%)	
	A/A	5 (71,4%)	/	0 (0%)	0 (0%)	2 (28,6%)	7 (100%)	
Ukupno		23 (76,7%)	/	2 (6,7%)	1 (3,3%)	4 (13,3%)	30 (100%)	
DHFR 680	A/A	1 (50%)	/	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	2 (100%)	0,061
	C/A	10 (76,9%)	/	0 (0%)	0 (0%)	3 (23,1%)	13 (100%)	
	C/C	12 (80%)	/	2 (13,3%)	1 (6,7%)	0 (0%)	15 (100%)	
Ukupno		23 (76,7%)	/	2 (6,7%)	1 (3,3%)	4 (13,3%)	30 (100%)	
DHFR 675	A/A	11 (73,3%)	/	0 (0%)	1 (6,7%)	3 (20%)	15 (100%)	0,358
	A/G	9 (75%)	/	2 (16,7%)	0 (0%)	1 (8,3%)	12 (100%)	
	G/G	3 (100%)	/	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	
Ukupno		23 (76,7%)	/	2 (6,7%)	1 (3,3%)	4 (13,3%)	30 (100%)	
DHFR 556	T/T	10 (71,4%)	/	0 (0%)	1 (7,1%)	3 (21,4%)	14 (100%)	0,323
	T/C	10 (76,9%)	/	2 (15,4%)	0 (0%)	1 (7,1%)	13 (100%)	
	C/C	3 (100%)	/	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	
Ukupno		23 (76,7%)	/	2 (6,7%)	1 (3,3%)	4 (13,3%)	30 (100%)	
DHFR 464	A/A	10 (71,4%)	/	0 (0%)	1 (7,1%)	3 (21,4%)	20 (100%)	0,323
	A/T	10 (76,9%)	/	2 (15,4%)	0 (0%)	1 (7,1%)	19 (100%)	
	T/T	3 (100%)	/	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	
Ukupno		23 (76,7%)	/	2 (6,7%)	1 (3,3%)	4 (13,3%)	30 (100%)	
DHFR 317	A/A	8 (72,7%)	/	2 (18,2%)	1 (9,1%)	0 (0%)	11 (100%)	0,093
	A/G	12 (80%)	/	0 (0%)	0 (0%)	3 (20%)	15 (100%)	
	G/G	3 (75%)	/	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	4 (100%)	
Ukupno		23 (76,7%)	/	2 (6,7%)	1 (3,3%)	4 (13,3%)	30 (100%)	

4.12. Distribucija gradusa i tipa toksi nosti tokom primene MTX

U odnosu na CTC-NCI skalu, toksi nost se gradira od 0 (bez neželjenih efekata) do 4 (najintenzivniji, životno-ugrožavaju i neželjeni efekti terapije). Tokom primene protokola mM, koji je sumarno prikazan prema smernicama protokola, najve i broj dece je ispoljio gradus 1 toksi nosti ($p < 0,0001$), potom gradus 2 i u najmanjoj meri gradus 3, dok nijedno dete nije ispoljilo gradus 4 toksi nosti. Što se ti e tipa neželjenih efekata terapije MTX, na prvom mestu je infekcija, koju prate toksi nosti GIT-a, OM i hepatotoksi nost, dok su ostale komplikacije bile zna ajno manje zastupljene. Gradus i tip toksi nosti tokom protokola mM su predstavljeni na Grafikonu 23.

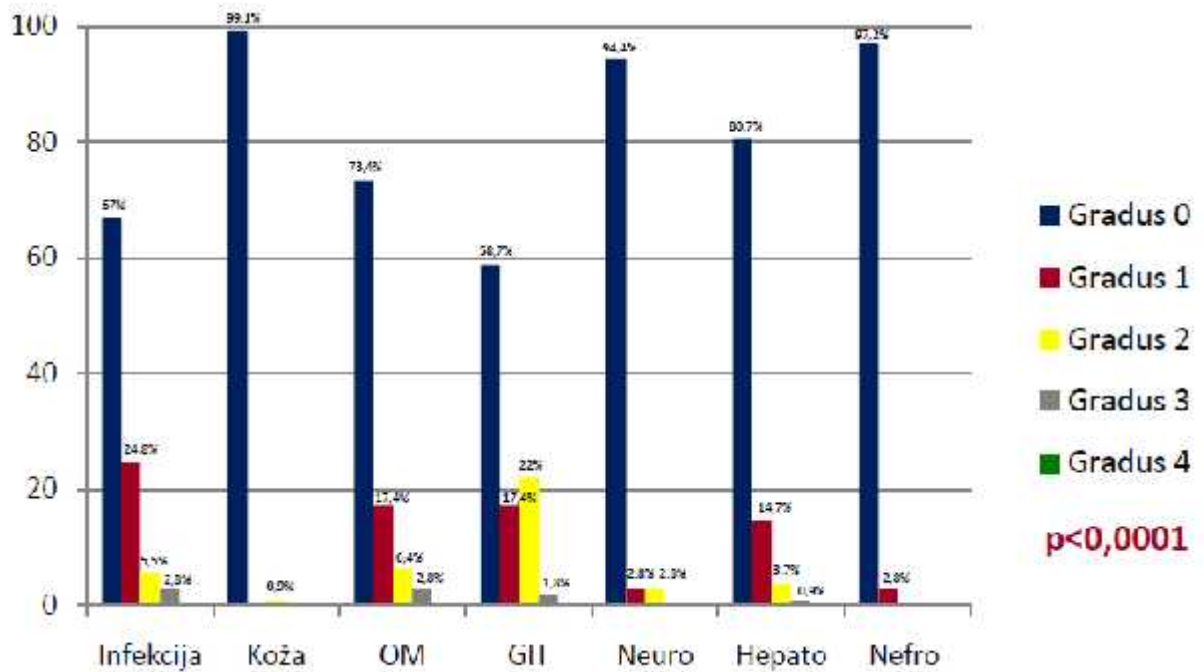
Kada se posmatraju pojedina ni ciklusi MTX, ordinirani u protokolu M, vrlo je sli no zastupljen gradus toksi nosti: tokom 1. M ciklusa najve i broj dece je ispoljio gradus 1 ($p < 0,0001$), potom gradus 2 i u najmanjoj meri gradus 3, dok nijedno dete nije ispoljilo gradus 4. U nešto ve em procentu se registruju neželjeni efekti GIT-a. (Grafikon 24).

U toku primene 2. M gradus 3 se registruje samo kod hepatotoksi nosti, a raste procenat dece sa ispoljenom nefrotoksi noš u, što je pokazano na Grafikonu 25.

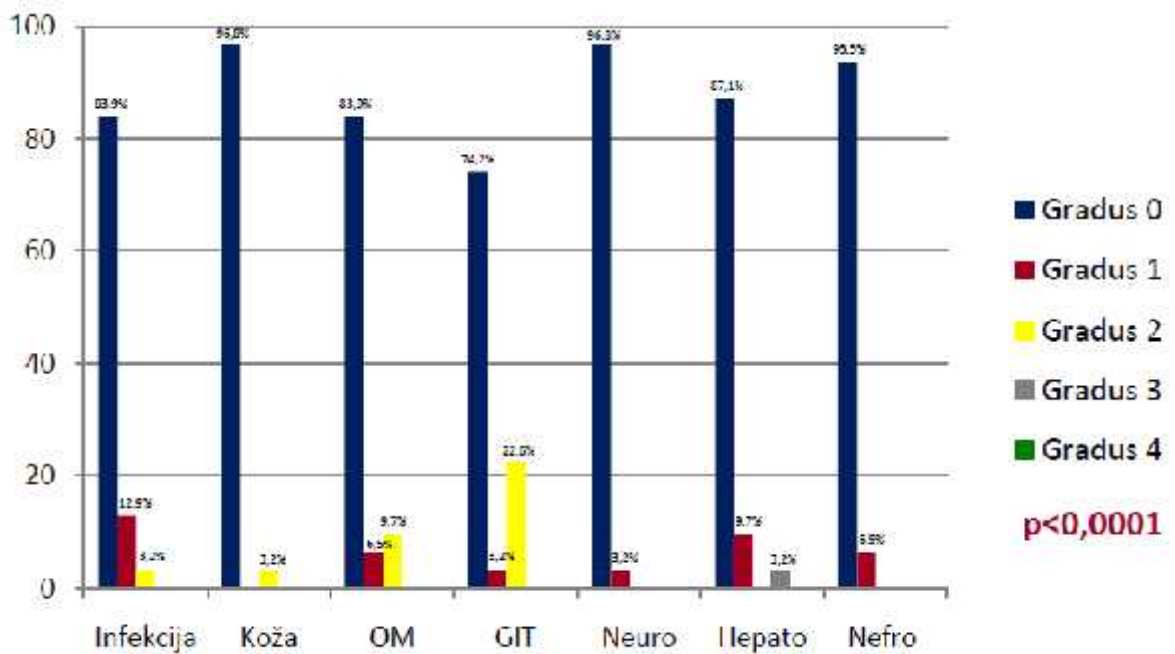
Tokom ciklusa 3. M je vrlo sli na situacija u ispoljavanju tipa i gradusa toksi nosti sa prethodnim, sa izostankom neuroloških komplikacija, koji su u malom procentu bili prisutni u prethodna dva ciklusa, što je predstavljeno na Grafikonu 26.

Pra enje neželjenih efekata primene MTX u toku 4. M je ukazao na rast gradusa i procenta dece sa toksi noš u GIT-a, dok je OM izostao kao komplikacija terapije (Grafikon 27).

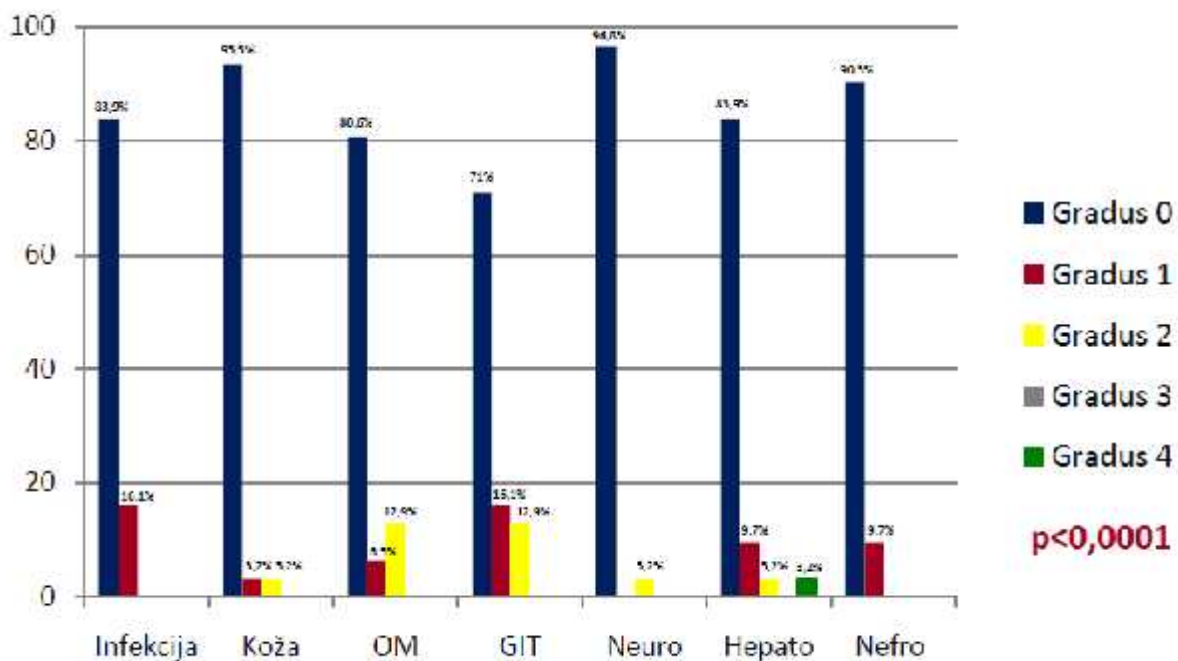
Ni u jednog deteta se tokom primene protokola M tako e nije registrovala toksi nost gradusa 4.



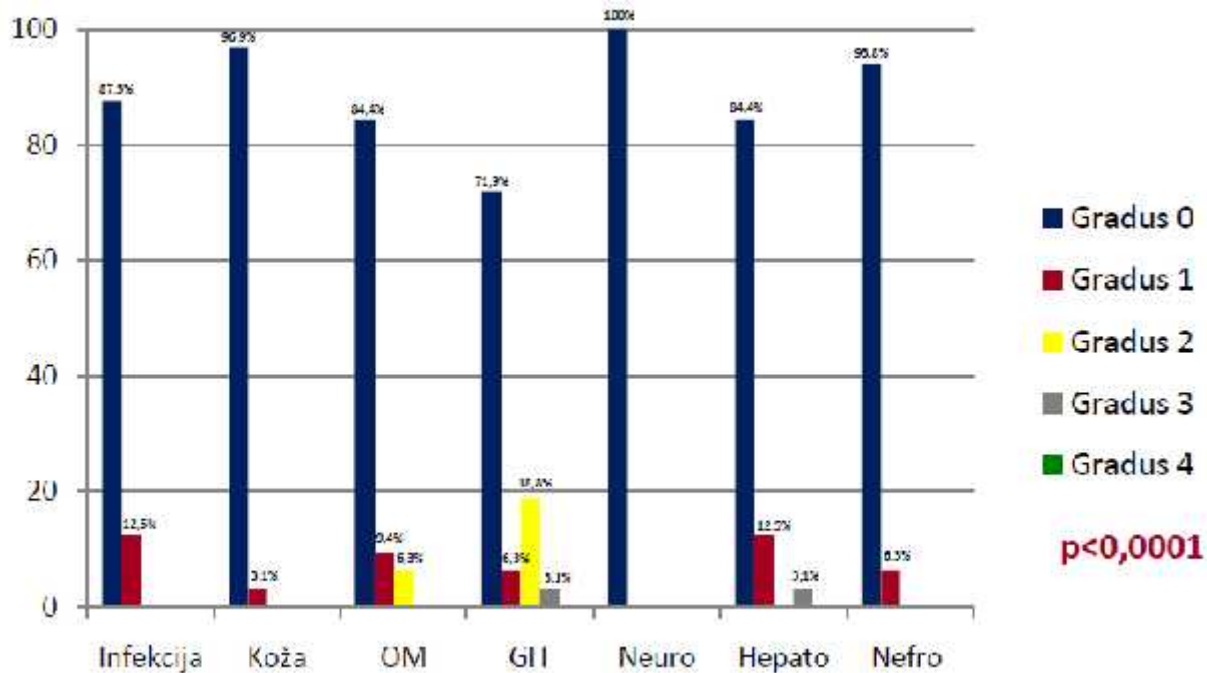
Grafikon 23. Distribucija gradusa i vrste toksi nosti tokom protokola mM



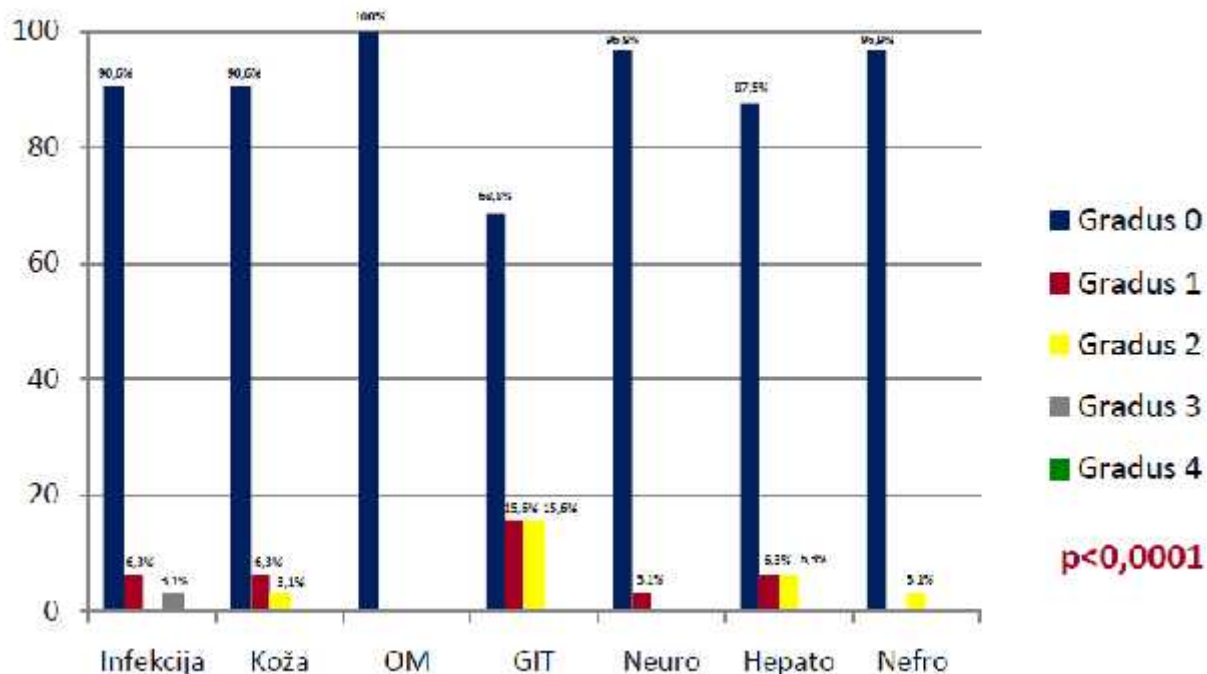
Grafikon 24. Distribucija gradusa i vrste toksi nosti tokom 1. M ciklusa



Grafikon 25. Distribucija gradusa i vrste toksikosti tokom 2. M ciklusa



Grafikon 26. Distribucija gradusa i vrste toksikosti tokom 3. M ciklusa



Grafikon 27. Distribucija gradusa i vrste toksi nosti tokom 4. M ciklusa

4.13. Korelacija gradusa i tipa toksi nosti tokom primene MTX sa polimorfizmima u ispitivanim genima

Izvojeni su polimorfizmi koji su od najvećeg značaja za praćenje toksi nosti MTX.

Tokom primene 2. M varijanta 28bp u genu za *TYMS* je pokazala povezanost ($p=0,043$) sa pojavom i većim gradusom OM (Tabela 26), kao i tokom 4. M ciklusa (Tabela 27), sa još većom statističkom značajnošću ($p=0,032$). U 4. M se takođe izdvojila varijanta -317 u genu za *DHFR* kao prediktivni faktor za ispoljavanje hepatotoksi nosti, što je predstavljeno u Tabeli 28.

Kako je na terapiji HR blokovima bio najmanji broj pacijenata, koji su uz MTX primali druge citostatske agense, oni su izuzeti iz poređenja sa ispitivanim polimorfizmima. Na Grafikonu 28 je pokazana ukupna toksi nost tokom primene HR blokova.

Tabela 26. Korelacija OM i ispitivanih polimorfizama tokom primene 2. M

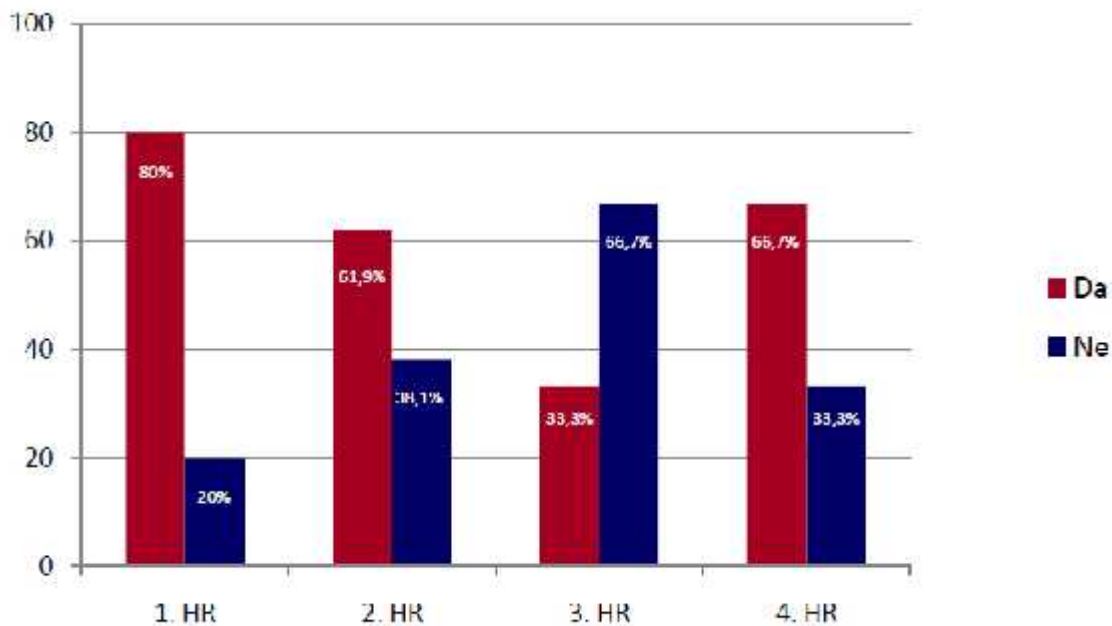
Polimorfizmi		2. M – oralni mukozitis			Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Gradus 0	Gradus 1	Gradus 2		
TYMS 6bp	I/I	12 (80%)	1 (6,7%)	2 (13,3%)	15 (100%)	0,883
	I/D	8 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)	
	D/D	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	5 (100%)	
Ukupno		23 (82,1%)	2 (7,1%)	3 (10,7%)	28 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	4 (66,7%)	0 (0%)	2 (33,3%)	6 (100%)	0,043
	3/2	12 (92,3%)	0 (0%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
	2/2	7 (77,8%)	2 (22,2%)	0 (0%)	9 (100%)	
Ukupno		23 (82,1%)	2 (7,1%)	3 (10,7%)	28 (100%)	
MTHFR 677	C/C	12 (92,3%)	0 (0%)	1 (7,7%)	13 (100%)	0,589
	C/T	8 (66,7%)	2 (16,7%)	2 (16,7%)	12 (100%)	
	T/T	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	
Ukupno		23 (82,1%)	2 (7,1%)	3 (10,7%)	28 (100%)	
MTFHR 1298	A/A	11 (78,6%)	1 (7,1%)	2 (14,3%)	14 (100%)	0,924
	A/C	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)	8 (100%)	
	C/C	5 (83,3%)	0 (0%)	1 (16,7%)	6 (100%)	
Ukupno		23 (82,1%)	2 (7,1%)	3 (10,7%)	28 (100%)	
SLC19A1	G/G	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)	0,592
	G/A	10 (71,4%)	1 (7,1%)	3 (21,4%)	14 (100%)	
	A/A	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0 (0%)	7 (100%)	
Ukupno		23 (82,1%)	2 (7,1%)	3 (10,7%)	28 (100%)	
DHFR 680	A/A	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0,312
	C/A	9 (90%)	1 (10%)	0 (0%)	10 (100%)	
	C/C	12 (75%)	1 (6,2%)	3 (18,8%)	16 (100%)	
Ukupno		23 (82,1%)	2 (7,1%)	3 (10,7%)	28 (100%)	
DHFR 675	A/A	13 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (100%)	0,183
	A/G	8 (61,5%)	2 (15,4%)	3 (23,1%)	13 (100%)	
	G/G	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	
Ukupno		23 (82,1%)	2 (7,1%)	3 (10,7%)	28 (100%)	
DHFR 556	T/T	12 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (100%)	0,244
	T/C	9 (64,3%)	2 (14,3%)	3 (21,4%)	14 (100%)	
	C/C	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	
Ukupno		23 (82,1%)	2 (7,1%)	3 (10,7%)	28 (100%)	
DHFR 464	A/A	12 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (100%)	0,244
	A/T	9 (64,3%)	2 (14,3%)	3 (21,4%)	14 (100%)	
	T/T	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	
Ukupno		23 (82,1%)	2 (7,1%)	3 (10,7%)	28 (100%)	
DHFR 317	A/A	9 (75%)	1 (8,3%)	2 (16,7%)	12 (100%)	0,583
	A/G	11 (84,6%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
	G/G	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	
Ukupno		23 (82,1%)	2 (7,1%)	3 (10,7%)	28 (100%)	

Tabela 27. Korelacija OM i ispitivanih polimorfizama tokom primene 4. M

Polimorfizmi		4. M – oralni mukozitis		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Gradus 0	Gradus 1		
TYMS 6bp	I/I	14 (93,3%)	1 (6,7%)	15 (100%)	0,636
	I/D	9 (100%)	0 (0%)	9 (100%)	
	D/D	4 (80%)	1 (20%)	5 (100%)	
Ukupno		27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	4 (66,7%)	2 (33,3%)	6 (100%)	0,032
	3/2	14 (100%)	0 (0%)	14 (100%)	
	2/2	9 (100%)	0 (0%)	9 (100%)	
Ukupno		27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
MTHFR 677	C/C	14 (100%)	0 (0%)	14 (100%)	0,295
	C/T	10 (83,3%)	2 (16,7%)	12 (100%)	
	T/T	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)	
Ukupno		27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	13 (86,7%)	2 (13,3%)	15 (100%)	0,187
	A/C	8 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	
	C/C	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	
Ukupno		27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
SLC19A1	G/G	7 (100%)	0 (0%)	7 (100%)	1,000
	G/A	13 (86,7%)	2 (13,3%)	15 (100%)	
	A/A	7 (100%)	0 (0%)	7 (100%)	
Ukupno		27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
DHFR 680	A/A	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0,205
	C/A	11 (100%)	0 (0%)	11 (100%)	
	C/C	14 (87,5%)	2 (12,5%)	16 (100%)	
Ukupno		27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
DHFR 675	A/A	14 (100%)	0 (0%)	14 (100%)	0,248
	A/G	11 (84,6%)	2 (15,4%)	13 (100%)	
	G/G	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	
Ukupno		27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
DHFR 556	T/T	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0,289
	T/C	12 (85,7%)	2 (14,3%)	14 (100%)	
	C/C	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	
Ukupno		27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
DHFR 464	A/A	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	0,289
	A/T	12 (85,7%)	2 (14,3%)	14 (100%)	
	T/T	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	
Ukupno		27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
DHFR 317	A/A	11 (91,7%)	1 (8,3%)	12 (100%)	0,672
	A/G	12 (92,3%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
	G/G	4 (100%)	0 (0%)	4 (100%)	
Ukupno		27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100%)	

Tabela 28. Korelacija hepatotoksičnosti i ispitivanih polimorfizama tokom primene 4. M

Polimorfizmi		4. M – hepatotoksičnost			Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Gradus 0	Gradus 1	Gradus 2		
TYMS 6bp	I/I	14 (93,3%)	0 (0%)	1 (6,7%)	15 (100%)	0,274
	I/D	7 (77,8%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	9 (100%)	
	D/D	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)	5 (100%)	
Ukupno		25 (86,2%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	5 (83,3%)	1 (16,7%)	0 (0%)	6 (100%)	0,447
	3/2	11 (78,6%)	1 (7,1%)	2 (14,3%)	14 (100%)	
	2/2	9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (100%)	
Ukupno		25 (86,2%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
MTHFR 677	C/C	11 (78,6%)	2 (14,3%)	1 (7,1%)	14 (100%)	0,345
	C/T	11 (91,7%)	0 (0%)	1 (8,3%)	12 (100%)	
	T/T	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	
Ukupno		25 (86,2%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
MTFHR 1298	A/A	14 (93,3%)	0 (0%)	1 (6,7%)	15 (100%)	0,277
	A/C	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)	8 (100%)	
	C/C	4 (66,7%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	6 (100%)	
Ukupno		25 (86,2%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
SLC19A1	G/G	6 (85,7%)	0 (0%)	1 (14,3%)	7 (100%)	0,583
	G/A	14 (93,3%)	1 (6,7%)	0 (0%)	15 (100%)	
	A/A	5 (71,4%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)	7 (100%)	
Ukupno		25 (86,2%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
DHFR 680	A/A	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	2 (100%)	0,133
	C/A	9 (81,8%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	11 (100%)	
	C/C	15 (93,8%)	0 (0%)	1 (6,2%)	16 (100%)	
Ukupno		25 (86,2%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
DHFR 675	A/A	11 (78,6%)	2 (14,3%)	1 (7,1%)	14 (100%)	0,341
	A/G	12 (92,3%)	0 (0%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
	G/G	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	
Ukupno		25 (86,2%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
DHFR 556	T/T	10 (76,9%)	2 (15,4%)	1 (7,7%)	13 (100%)	0,286
	T/C	13 (92,9%)	0 (0%)	1 (7,1%)	14 (100%)	
	C/C	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	
Ukupno		25 (86,2%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
DHFR 464	A/A	10 (76,9%)	2 (15,4%)	1 (7,7%)	13 (100%)	0,286
	A/T	13 (92,9%)	0 (0%)	1 (7,1%)	14 (100%)	
	T/T	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	
Ukupno		25 (86,2%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	29 (100%)	
DHFR 317	A/A	12 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (100%)	0,041
	A/G	11 (84,6%)	0 (0%)	2 (15,4%)	13 (100%)	
	G/G	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	4 (100%)	
Ukupno		25 (86,2%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	29 (100%)	



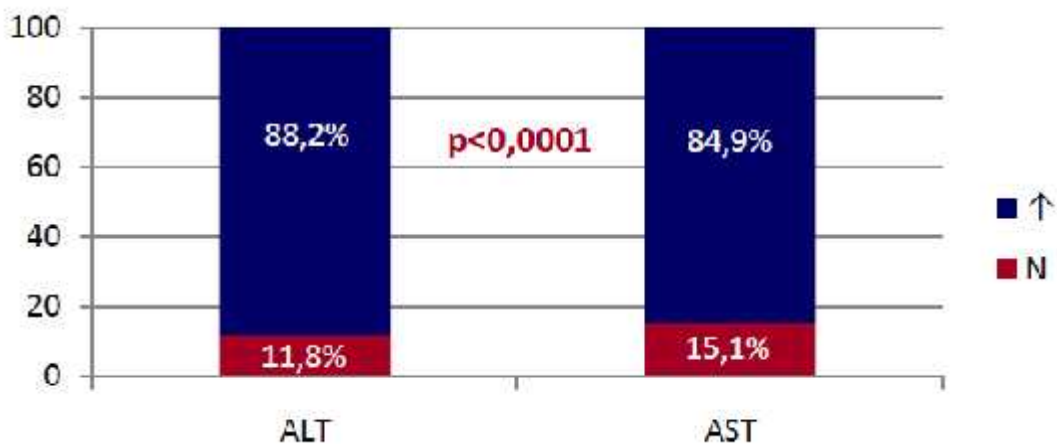
Grafikon 28. Ukupna toksi nost tokom primene HR blokova

4.14. Toksi nost tokom peroralne primene MTX

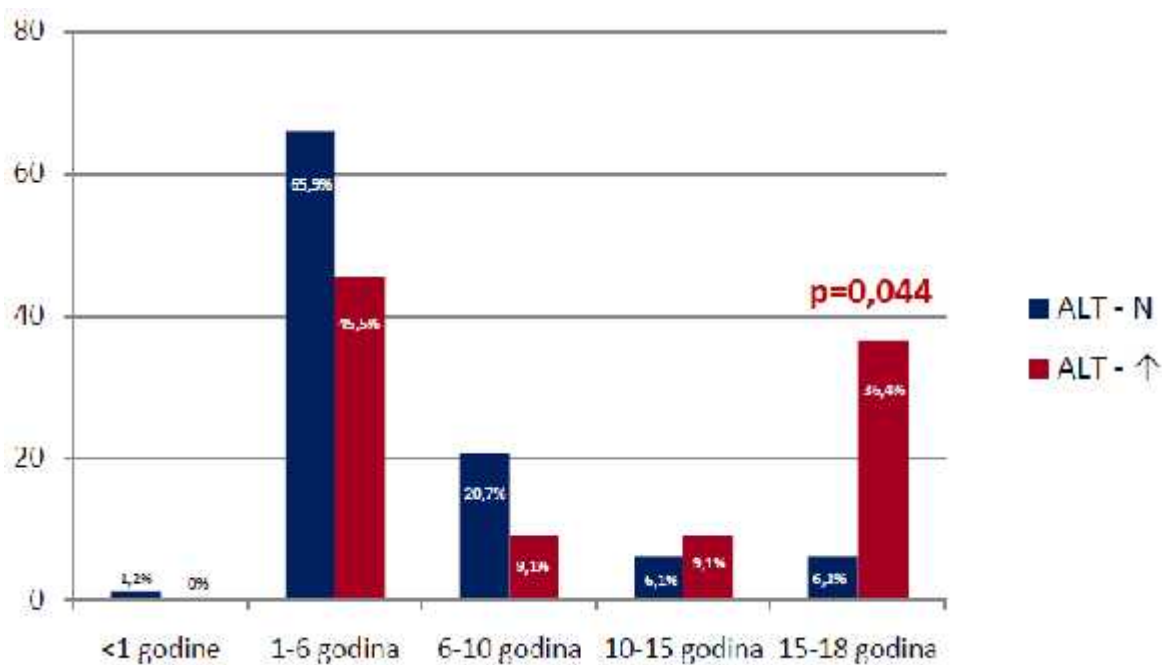
Peroralna terapija MTX u fazi održavanja traje zna ajno duže od parenteralne u fazi konsolidacije, ali se primenjuje u daleko manjim dozama (20 mg/m^2), jednom nedeljno, tokom 13-18 meseci. Toksi nost tokom peroralne primene MTX se procenjuje preko parametara krvne slike i biohemije, gde se od najve eg zna aja pra enje funkcije jetre – hepatotoksi nost.

U najve em broju dece (>85%) je registrovana hepatotoksi nost tokom terapije održavanja ($p < 0,0001$), što je predstavljeno na Grafikonu 29.

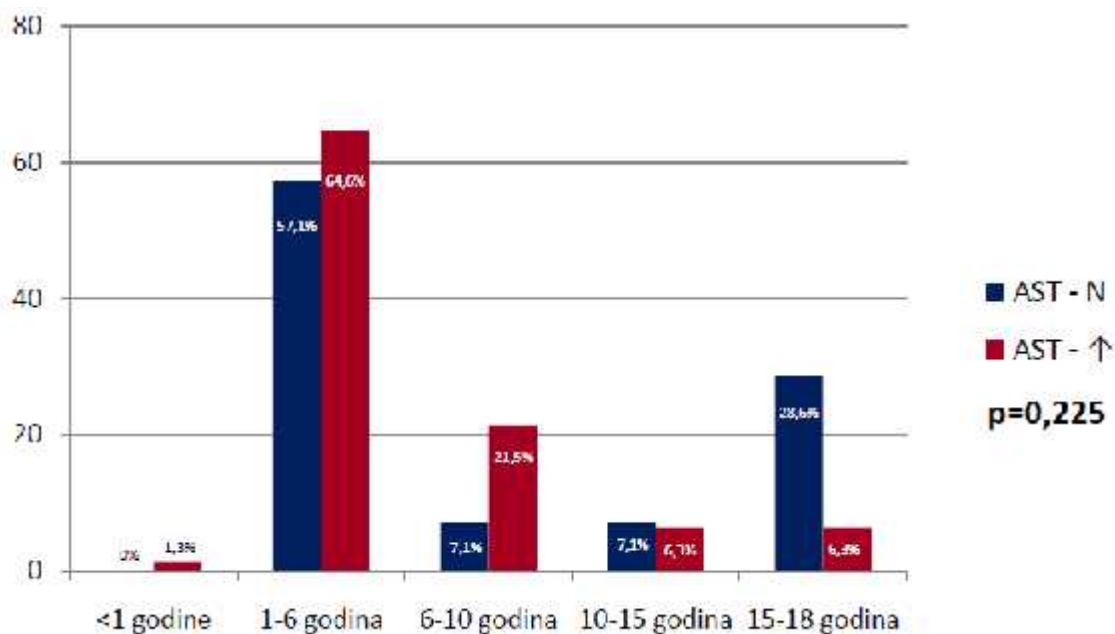
Distribucija po polu u odnosu na hepatotoksi nost nije pokazala statisti ku zna ajnost, ali jeste po uzrasnim grupama – najstarija deca su eš e ispoljila neželjene efekte terapije na funkciju jetre ($p = 0,044$) tokom peroralne primene MTX (Grafikon 30). Korelacija je potvr ena kroz povišene vrednosti ALT, što se nije odnosilo na AST (Grafikon 31).



Grafikon 29. Distribucija ispitanika u odnosu na povišene vrednosti AST i ALT tokom peroralne primene MTX

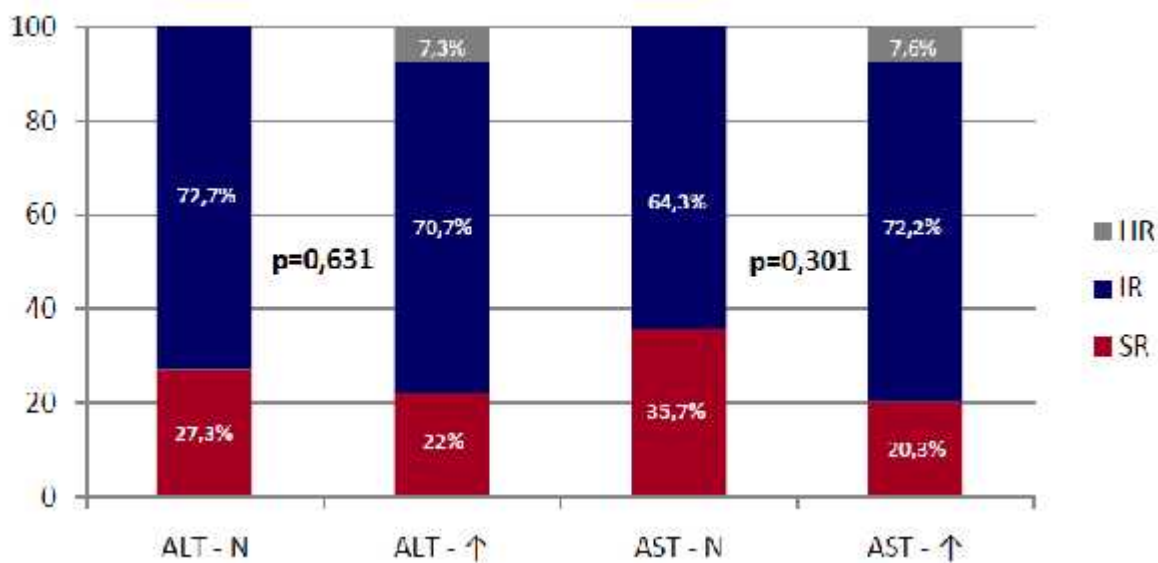


Grafikon 30. Distribucija ispitanika po uzrastu u odnosu na povišene vrednosti ALT tokom peroralne primene MTX



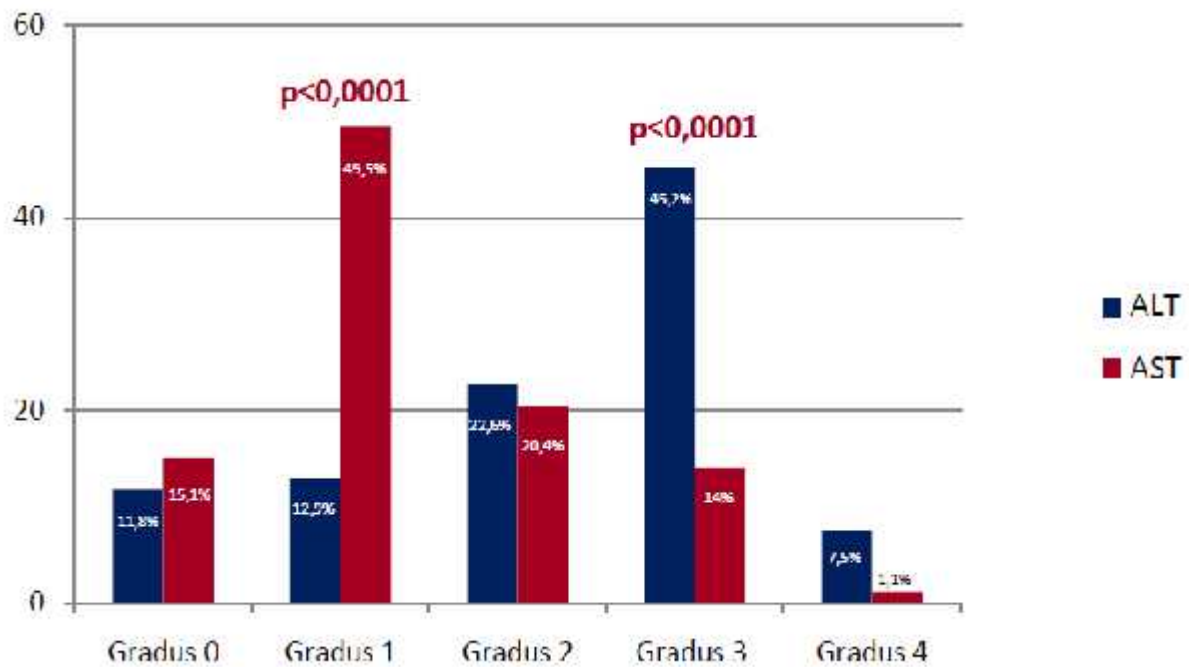
Grafikon 31. Distribucija ispitanika po uzrastu u odnosu na povišene vrednosti AST tokom peroralne primene MTX

Pored korelacije sa polom i uzrastom, ispitana je i povezanost grupa rizika sa ispoljavanjem toksikoznosti MTX u fazi održavanja, sa idejom da su deca koja su prethodno bila izložena intenzivnijoj terapiji imala veći procenat neželjenih efekata u završnoj fazi lečenja, ali nije viđena statistička značajnost (Grafikon 32).



Grafikon 32. Korelacija povišenih vrednosti ALT i AST u odnosu na grupu rizika

Istražena je i distribucija gradusa hepatotoksičnosti i pokazano je da su najčešće bili zastupljeni gradus 1 i gradus 3, što je predstavljeno na Grafikonu 33.



Grafikon 33. Distribucija ispitanika u odnosu na gradus povišene vrednosti AST i ALT tokom peroralne primene MTX

4.15. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa toksičnošću u MTX u fazi održavanja

Varijante u genima *MTHFR*, *DHFR*, *SLC19A1* i *TYMS* se nisu pokazale prediktivnim tokom primene peroralnog MTX. U pitanju su znatno manje doze od prethodno opisanih tokom parenteralne terapije. Nijedan polimorfizam nije korelirao sa hepatotoksičnošću u tokom terapije održavanja, što je prikazano u odnosu na povezanost sa povišenim vrednostima ALT (Tabela 29) i AST (Tabela 30).

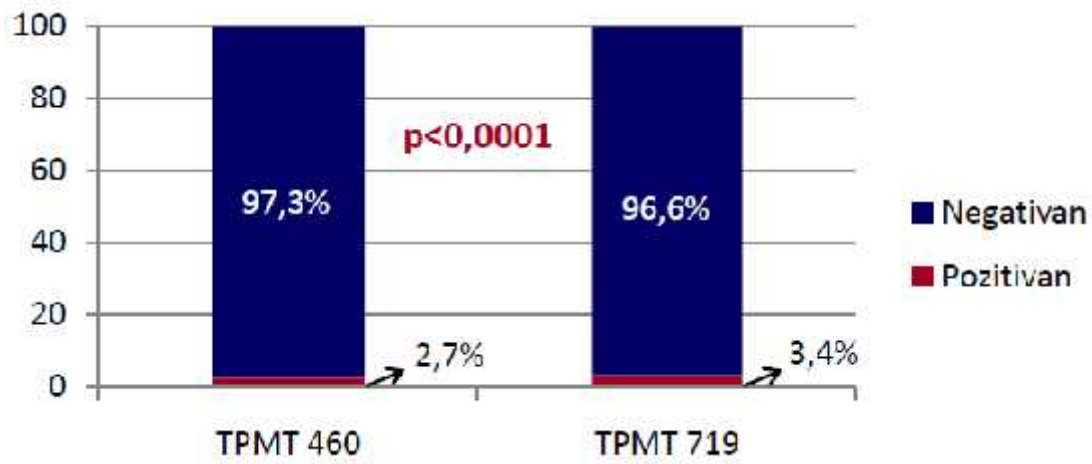
Zbog kontinuirane primene drugog leka u terapiji održavanja (6-Mercaptopurine), za koji su već izdvojeni polimorfizmi od značaja, ispitana je incidenca varijanti 460 i 719 u genu za tiopurin-metiltransferazu (*TPMT*), gde je višen pozitivan heterozigotni ili homozigotni status u izrazito malom broju dece (Grafikon 34). Istražena je i povezanost ispitivanih polimorfizama sa varijantama u *TPMT* genu, gde nije nađena unakrsna korelacija, što je prikazano u Tabeli 31 za varijantu 460 i u Tabeli 32 za varijantu 719.

Tabela 29. Korelacija vrednosti ALT sa ispitanim polimorfizmima tokom peroralne primene MTX

Polimorfizmi		Vrednost ALT		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Povišena	U granicama		
TYMS 6bp	I/I	36 (87,8%)	5 (12,2%)	41 (100%)	0,754
	I/D	33 (89,2%)	4 (10,8%)	37 (100%)	
	D/D	8 (80%)	2 (20%)	10 (100%)	
Ukupno		77 (87,5%)	11 (12,5%)	88 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	22 (88%)	3 (12%)	25 (100%)	0,750
	3/2	34 (85%)	6 (15%)	40 (100%)	
	2/2	21 (91,3%)	2 (8,7%)	23 (100%)	
Ukupno		77 (87,5%)	11 (12,5%)	88 (100%)	
MTHFR 677	C/C	38 (88,4%)	5 (11,6%)	43 (100%)	0,733
	C/T	35 (87,5%)	5 (12,5%)	40 (100%)	
	T/T	4 (80%)	1 (20%)	5 (100%)	
Ukupno		77 (87,5%)	11 (12,5%)	88 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	33 (84,6%)	6 (15,4%)	39 (100%)	0,300
	A/C	32 (86,5%)	5 (13,5%)	37 (100%)	
	C/C	11 (100%)	0 (0%)	11 (100%)	
Ukupno		76 (87,4%)	11 (12,6%)	87 (100%)	
SLC19A1	G/G	22 (95,7%)	1 (4,3%)	23 (100%)	0,304
	G/A	36 (83,7%)	7 (16,3%)	43 (100%)	
	A/A	18 (85,7%)	3 (14,3%)	21 (100%)	
Ukupno		76 (87,4%)	11 (12,6%)	87 (100%)	
DHFR 680	A/A	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6 (100%)	0,311
	C/A	37 (92,5%)	3 (7,5%)	40 (100%)	
	C/C	33 (82,5%)	7 (17,5%)	40 (100%)	
Ukupno		75 (87,2%)	11 (12,8%)	86 (100%)	
DHFR 675	A/A	39 (84,8%)	7 (15,2%)	46 (100%)	0,506
	A/G	28 (90,3%)	3 (9,7%)	31 (100%)	
	G/G	8 (88,9%)	1 (11,1%)	9 (100%)	
Ukupno		75 (87,2%)	11 (12,8%)	86 (100%)	
DHFR 556	T/T	38 (84,4%)	7 (15,6%)	45 (100%)	0,462
	T/C	29 (90,6%)	3 (9,4%)	32 (100%)	
	C/C	8 (88,9%)	1 (11,1%)	9 (100%)	
Ukupno		75 (87,2%)	11 (12,8%)	86 (100%)	
DHFR 464	A/A	38 (86,4%)	6 (13,6%)	44 (100%)	0,801
	A/T	29 (87,9%)	4 (12,1%)	33 (100%)	
	T/T	8 (88,9%)	1 (11,1%)	9 (100%)	
Ukupno		75 (87,2%)	11 (12,8%)	86 (100%)	
DHFR 317	A/A	26 (83,9%)	5 (16,1%)	31 (100%)	0,717
	A/G	39 (90,7%)	4 (9,3%)	43 (100%)	
	G/G	10 (83,3%)	2 (16,7%)	12 (100%)	
Ukupno		75 (87,2%)	11 (12,8%)	86 (100%)	

Tabela 30. Korelacija vrednosti ALT sa ispitanim polimorfizmima tokom peroralne primene MTX

Polimorfizmi		Vrednost AST		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Povišena	U granicama		
TYMS 6bp	I/I	35 (85,4%)	6 (14,6%)	41 (100%)	0,706
	I/D	31 (83,8%)	6 (16,2%)	37 (100%)	
	D/D	8 (80%)	2 (20%)	10 (100%)	
Ukupno		74 (84,1%)	14 (15,9%)	88 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	21 (84%)	4 (16%)	25 (100%)	0,516
	3/2	32 (80%)	8 (20%)	40 (100%)	
	2/2	21 (91,3%)	2 (8,7%)	23 (100%)	
Ukupno		74 (84,1%)	14 (15,9%)	88 (100%)	
MTHFR 677	C/C	36 (83,7%)	7 (16,3%)	43 (100%)	0,980
	C/T	34 (85%)	6 (15%)	40 (100%)	
	T/T	4 (80%)	1 (20%)	5 (100%)	
Ukupno		74 (84,1%)	14 (15,9%)	88 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	33 (84,6%)	6 (15,4%)	39 (100%)	0,685
	A/C	29 (78,4%)	8 (21,6%)	37 (100%)	
	C/C	11 (100%)	0 (0%)	11 (100%)	
Ukupno		73 (83,9%)	14 (16,1%)	87 (100%)	
SLC19A1	G/G	21 (91,3%)	2 (8,7%)	23 (100%)	0,581
	G/A	34 (79,1%)	9 (20,9%)	43 (100%)	
	A/A	18 (85,7%)	3 (14,3%)	21 (100%)	
Ukupno		73 (83,9%)	14 (16,1%)	87 (100%)	
DHFR 680	A/A	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6 (100%)	0,195
	C/A	36 (90%)	4 (10%)	40 (100%)	
	C/C	31 (77,5%)	9 (22,5%)	40 (100%)	
Ukupno		72 (83,7%)	14 (16,3%)	86 (100%)	
DHFR 675	A/A	36 (78,3%)	10 (21,7%)	46 (100%)	0,165
	A/G	28 (90,3%)	3 (9,7%)	31 (100%)	
	G/G	8 (88,9%)	1 (11,1%)	9 (100%)	
Ukupno		72 (83,7%)	14 (16,3%)	86 (100%)	
DHFR 556	T/T	35 (77,8%)	10 (22,2%)	45 (100%)	0,142
	T/C	29 (90,6%)	3 (9,4%)	32 (100%)	
	C/C	8 (88,9%)	1 (11,1%)	9 (100%)	
Ukupno		72 (83,7%)	14 (16,3%)	86 (100%)	
DHFR 464	A/A	35 (79,5%)	9 (20,5%)	44 (100%)	0,295
	A/T	29 (87,9%)	4 (12,1%)	33 (100%)	
	T/T	8 (88,9%)	1 (11,1%)	9 (100%)	
Ukupno		72 (83,7%)	14 (16,3%)	86 (100%)	
DHFR 317	A/A	25 (80,6%)	6 (19,4%)	31 (100%)	0,933
	A/G	38 (88,4%)	5 (11,6%)	43 (100%)	
	G/G	9 (75%)	3 (25%)	12 (100%)	
Ukupno		72 (83,7%)	14 (16,3%)	86 (100%)	



Grafikon 34. Incidenca varijanti 460 i 719 u genu za *TPMT*

Tabela 31. Korelacija varijante 460 u genu za *TPMT* i ispitivanih polimorfizama

Polimorfizmi		TPMT 460		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Negativan	Pozitivan		
TYMS 6bp	I/I	67 (97,1%)	2 (2,9%)	69 (100%)	0,858
	I/D	59 (98,3%)	1 (1,7%)	60 (100%)	
	D/D	16 (94,1%)	1 (5,9%)	17 (100%)	
Ukupno		142 (97,3%)	4 (2,7%)	146 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	47 (95,9%)	2 (4,1%)	49 (100%)	0,279
	3/2	60 (96,8%)	2 (3,2%)	62 (100%)	
	2/2	36 (100%)	0 (0%)	36 (100%)	
Ukupno		143 (97,3%)	4 (2,7%)	147 (100%)	
MTHFR 677	C/C	69 (98,6%)	1 (1,4%)	70 (100%)	0,590
	C/T	57 (95%)	3 (5%)	60 (100%)	
	T/T	17 (100%)	0 (0%)	17 (100%)	
Ukupno		143 (97,3%)	4 (2,7%)	147 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	68 (95,8%)	3 (4,2%)	71 (100%)	0,522
	A/C	57 (100%)	0 (0%)	57 (100%)	
	C/C	17 (94,4%)	1 (5,6%)	18 (100%)	
Ukupno		142 (97,3%)	4 (2,7%)	146 (100%)	
SLC19A1	G/G	38 (95%)	2 (5%)	40 (100%)	0,990
	G/A	67 (100%)	0 (0%)	67 (100%)	
	A/A	37 (94,9%)	2 (5,1%)	39 (100%)	
Ukupno		142 (97,3%)	4 (2,7%)	146 (100%)	
DHFR 680	A/A	15 (100%)	0 (0%)	15 (100%)	0,198
	C/A	63 (98,4%)	1 (1,6%)	64 (100%)	
	C/C	60 (95,2%)	3 (4,8%)	63 (100%)	
Ukupno		138 (97,2%)	4 (2,8%)	142 (100%)	
DHFR 675	A/A	74 (98,7%)	1 (1,3%)	75 (100%)	0,199
	A/G	52 (96,3%)	2 (3,7%)	54 (100%)	
	G/G	12 (92,3%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
Ukupno		138 (97,2%)	4 (2,8%)	142 (100%)	
DHFR 556	T/T	73 (98,6%)	1 (1,4%)	74 (100%)	0,207
	T/C	53 (96,4%)	2 (3,6%)	55 (100%)	
	C/C	12 (92,3%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
Ukupno		138 (97,2%)	4 (2,8%)	142 (100%)	
DHFR 464	A/A	72 (98,6%)	1 (1,4%)	73 (100%)	0,215
	A/T	54 (96,4%)	2 (3,6%)	56 (100%)	
	T/T	12 (92,3%)	1 (7,7%)	13 (100%)	
Ukupno		138 (97,2%)	4 (2,8%)	142 (100%)	
DHFR 317	A/A	47 (95,9%)	2 (4,1%)	49 (100%)	0,372
	A/G	69 (97,2%)	2 (2,8%)	71 (100%)	
	G/G	22 (100%)	0 (0%)	22 (100%)	
Ukupno		138 (97,2%)	4 (2,8%)	142 (100%)	

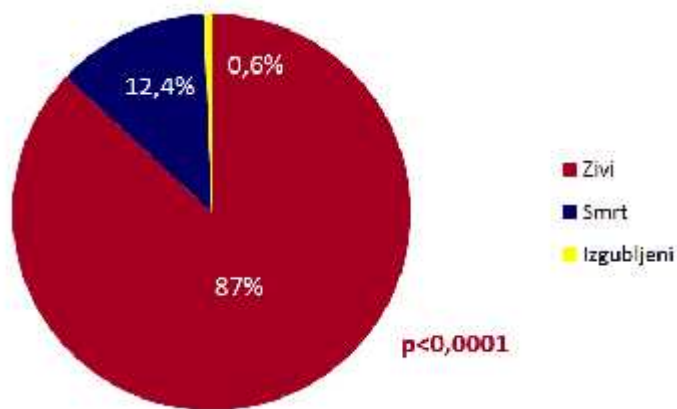
Tabela 32. Korelacija varijante 719 u genu za *TPMT* i ispitivanih polimorfizama

Polimorfizmi		TMPT 719		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Negativan	Pozitivan		
TYMS 6bp	I/I	66 (97,1%)	2 (2,9%)	68 (100%)	0,630
	I/D	58 (96,7%)	2 (3,3%)	60 (100%)	
	D/D	15 (93,8%)	1 (6,2%)	16 (100%)	
Ukupno		139 (96,5%)	5 (3,5%)	144 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	45 (93,8%)	3 (6,2%)	48 (100%)	0,122
	3/2	59 (96,7%)	2 (3,3%)	61 (100%)	
	2/2	36 (100%)	0 (0%)	36 (100%)	
Ukupno		140 (96,6%)	5 (3,4%)	145 (100%)	
MTHFR 677	C/C	68 (98,6%)	1 (1,4%)	69 (100%)	0,431
	C/T	55 (93,2%)	4 (6,8%)	59 (100%)	
	T/T	17 (100%)	0 (0%)	17 (100%)	
Ukupno		140 (96,6%)	5 (3,4%)	145 (100%)	
MTHFR 1298	A/A	68 (95,8%)	3 (4,2%)	71 (100%)	0,810
	A/C	54 (98,2%)	1 (1,8%)	55 (100%)	
	C/C	17 (94,4%)	1 (5,6%)	18 (100%)	
Ukupno		139 (96,5%)	5 (3,5%)	144 (100%)	
SLC19A1	G/G	38 (95%)	2 (5%)	40 (100%)	0,531
	G/A	65 (100%)	0 (0%)	65 (100%)	
	A/A	36 (92,3%)	3 (7,7%)	39 (100%)	
Ukupno		139 (96,5%)	5 (3,5%)	144 (100%)	
DHFR 680	A/A	14 (100%)	0 (0%)	14 (100%)	0,105
	C/A	63 (98,4%)	1 (1,6%)	64 (100%)	
	C/C	59 (93,7%)	4 (6,3%)	63 (100%)	
Ukupno		136 (96,5%)	5 (3,5%)	141 (100%)	
DHFR 675	A/A	73 (98,6%)	1 (1,4%)	74 (100%)	0,052
	A/G	52 (96,3%)	2 (3,7%)	54 (100%)	
	G/G	11 (84,6%)	2 (15,4%)	13 (100%)	
Ukupno		136 (96,5%)	5 (3,5%)	141 (100%)	
DHFR 556	T/T	72 (98,6%)	1 (1,4%)	73 (100%)	0,055
	T/C	53 (96,4%)	2 (3,6%)	55 (100%)	
	C/C	11 (84,6%)	2 (15,4%)	13 (100%)	
Ukupno		136 (96,5%)	5 (3,5%)	141 (100%)	
DHFR 464	A/A	71 (98,6%)	1 (1,4%)	72 (100%)	0,058
	A/T	54 (96,4%)	2 (3,6%)	56 (100%)	
	T/T	11 (84,6%)	2 (15,4%)	13 (100%)	
Ukupno		136 (96,5%)	5 (3,5%)	141 (100%)	
DHFR 317	A/A	46 (93,9%)	3 (6,1%)	49 (100%)	0,178
	A/G	69 (97,2%)	2 (2,8%)	71 (100%)	
	G/G	21 (100%)	0 (0%)	21 (100%)	
Ukupno		136 (96,5%)	5 (3,5%)	141 (100%)	

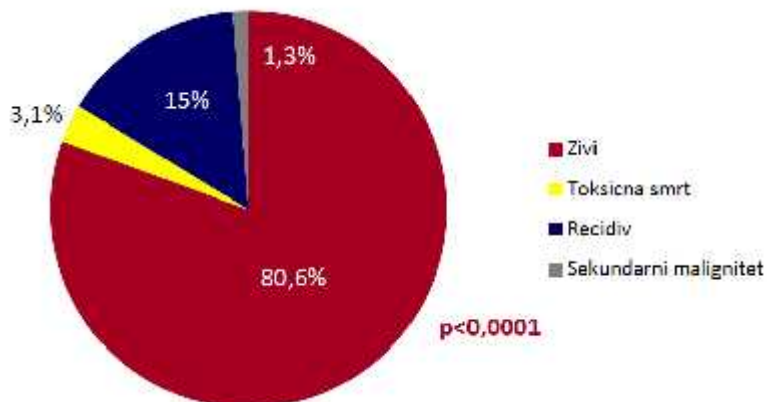
4.16. Preživljavanje dece sa ALL

U studijskoj grupi ispitanika je zabeleženo ukupno preživljavanje (engl. *Over-all survival* – OAS) od 87% (140/161), jedan pacijent je bio izgubljen za praćenje (engl. *Lost to follow-up* – LFU), dok je 12,4% pacijenata imalo fatalan ishod (20/161). OAS je predstavljen na Grafikonu 35.

Preživljavanje bez pojave događaja (engl. *Event-free survival* – EFS) je zabeleženo u 80,6% dece (130/161), od kojih je 15% (24/161) razvilo recidiv osnovne bolesti, 1,3% sekundarni malignitet (2/161), a u 3,1% (5/161) je konstatovana toksična smrt (Grafikon 36).

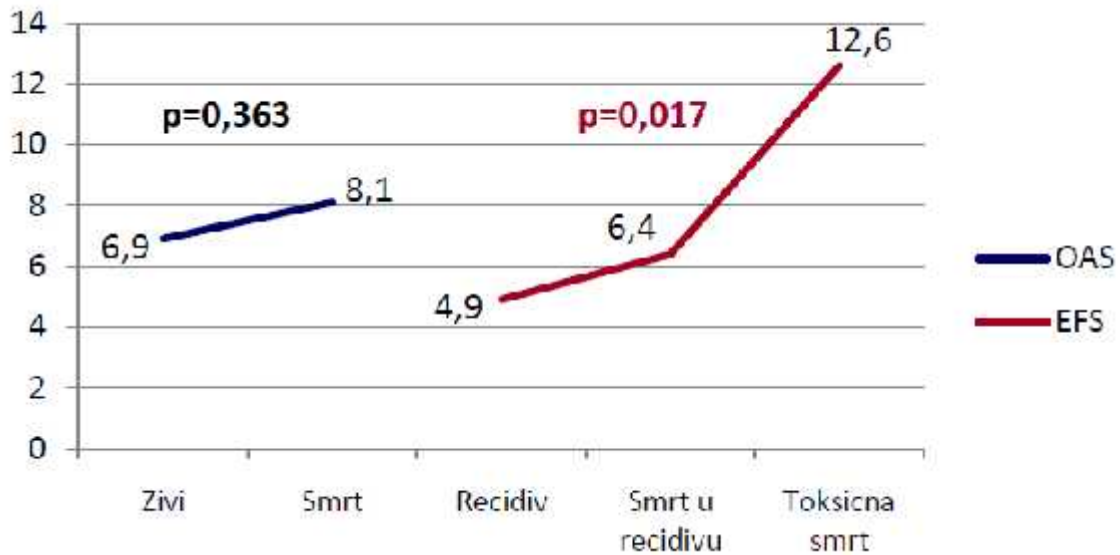


Grafikon 35. Distribucija ispitanika u odnosu na OAS



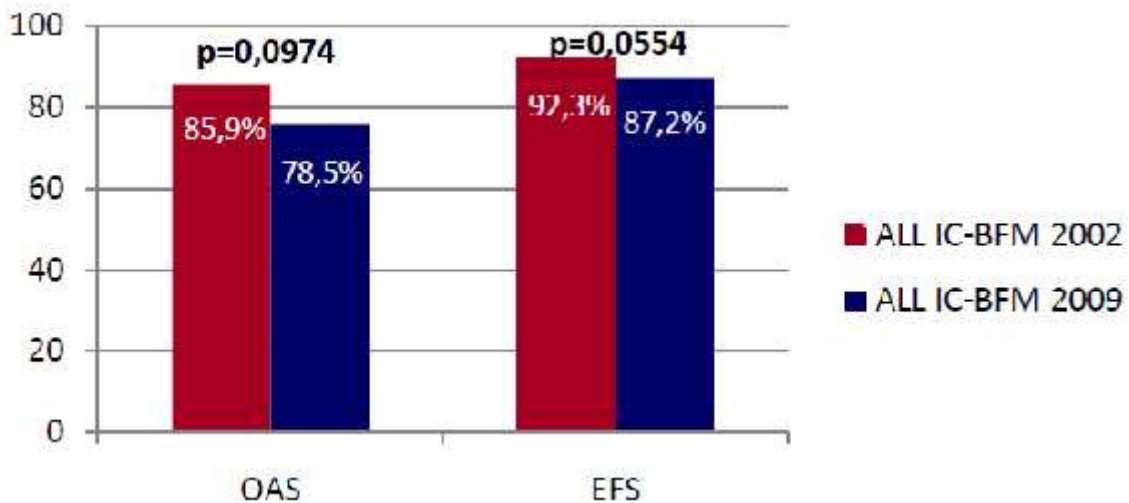
Grafikon 36. Distribucija ispitanika u odnosu na EFS

Nije vi ena korelacija OAS i EFS u odnosu na pol, ali je prime eno da je stariji uzrast povezan sa toksi nom smr u ($p=0,017$), što je prikazano na Grafikonu 37.



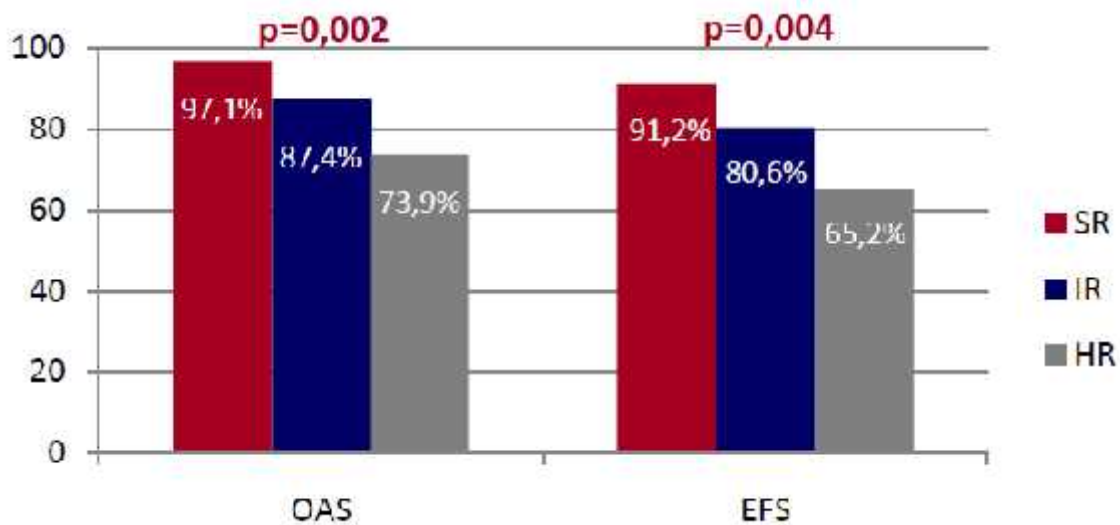
Grafikon 37. Komparacija OAS i EFS u odnosu na prose an uzrast ispitanika

Nije notirana statisti ki zna ajna razlika u preživljavanju u odnosu na primenjeni protokol le enja, što je predstavljeno na Grafikonu 38.



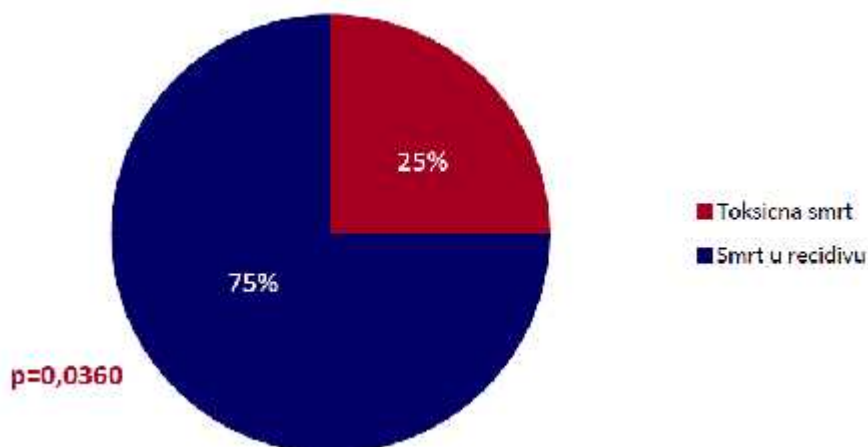
Grafikon 38. Komparacija OAS i EFS u odnosu na primenjen protokol le enja

O ekivano, pokazana je statisti ki zna ajna razlika u preživljavanju u odnosu na grupe rizika u OAS ($p=0,002$) i u EFS ($p=0,004$), što je prikazano na Grafikonu 39.

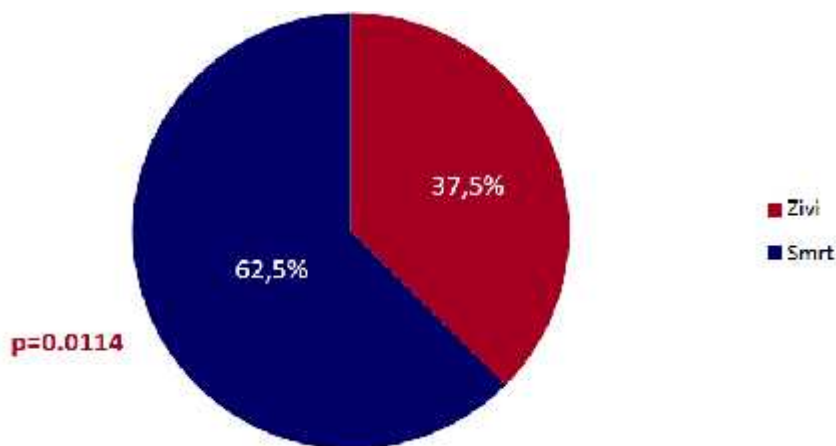


Grafikon 39. Komparacija preživljanja izme u OAS i EFS u odnosu na grupe rizika

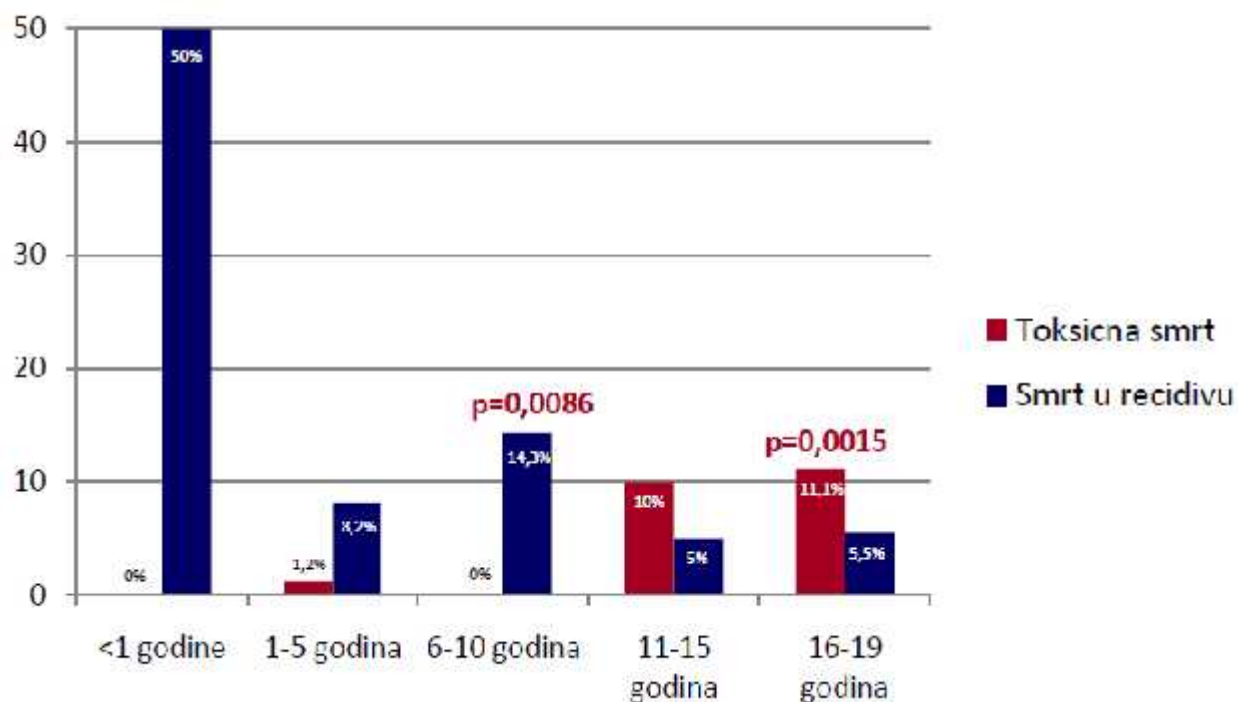
Zna ajno ve i broj dece ($p=0,036$) je imao smrtni ishod usled recidiva, nego zbog toksi nosti terapije (Grafikon 40). Preživljavanje u recidivu osnovne bolesti je zna ajno manje ($p=0,0114$) nego u inicijalnom le enju – 37,5% vs 87% (Grafikon 41). Što je stariji uzrast obolele dece, to je ve i procenat toksi nih smrti u odnosu na smrt usled recidiva bolesti ($p=0,0015$), što je prikazano na Grafikonu 42.



Grafikon 40. Distribucija ispitanika po uzroku smrti



Grafikon 41. Preživljavanje nakon recidiva



Grafikon 42. Distribucija ispitanika po uzrastu u odnosu na uzrok smrti

4.17. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa OAS i EFS

Polimorfizmi u genima za *MTHFR*, *DHFR*, *SLC19A1* i *TYMS* nisu pokazali povezanost sa OAS (Tabela 33), ali se izdvaja varijanta -464 T/T u genu za *DHFR* koja snažno asocira sa pojavom recidiva, što je predstavljeno u Tabeli 34.

Tabela 33. Korelacija polimorfizama u ispitivanim genima sa OAS

Polimorfizmi		Ishod		Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Živi	Smrt		
TYMS 6bp	I/I	61 (87,1%)	9 (12,9%)	70 (100%)	0,757
	I/D	54 (88,5%)	7 (11,5%)	61 (100%)	
	D/D	15 (93,8%)	1 (6,2%)	16 (100%)	
Ukupno		130 (88,4%)	17 (11,6%)	147 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	43 (87,8%)	6 (12,2%)	49 (100%)	0,977
	3/2	55 (88,7%)	7 (11,3%)	62 (100%)	
	2/2	33 (89,2%)	4 (10,8%)	37 (100%)	
Ukupno		131 (88,5%)	17 (11,5%)	148 (100%)	
MTHFR 677	C/C	61 (87,1%)	9 (12,9%)	70 (100%)	0,135
	C/T	57 (93,4%)	4 (6,6%)	61 (100%)	
	T/T	13 (76,5%)	4 (23,5%)	17 (100%)	
Ukupno		131 (88,5%)	17 (11,5%)	148 (100%)	
MTFHR 1298	A/A	62 (87,3%)	9 (12,7%)	71 (100%)	0,211
	A/C	52 (92,9%)	4 (7,1%)	56 (100%)	
	C/C	14 (77,8%)	4 (22,2%)	18 (100%)	
Ukupno		128 (88,3%)	17 (11,7%)	145 (100%)	
SLC19A1	G/G	35 (87,5%)	5 (12,5%)	40 (100%)	0,513
	G/A	57 (86,4%)	9 (13,6%)	66 (100%)	
	A/A	36 (92,3%)	3 (7,7%)	39 (100%)	
Ukupno		128 (88,3%)	17 (11,7%)	145 (100%)	
DHFR 680	A/A	13 (86,7%)	2 (13,3%)	15 (100%)	0,515
	C/A	54 (85,7%)	9 (14,3%)	63 (100%)	
	C/C	58 (92,1%)	5 (7,9%)	63 (100%)	
Ukupno		125 (88,7%)	16 (11,3%)	141 (100%)	
DHFR 675	A/A	66 (89,2%)	8 (10,8%)	74 (100%)	0,312
	A/G	46 (85,2%)	8 (14,8%)	54 (100%)	
	G/G	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		125 (88,7%)	16 (11,3%)	141 (100%)	
DHFR 556	T/T	65 (89%)	8 (11%)	73 (100%)	0,327
	T/C	47 (85,5%)	8 (14,5%)	55 (100%)	
	C/C	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		125 (88,7%)	16 (11,3%)	141 (100%)	
DHFR 464	A/A	64 (88,9%)	8 (11,1%)	72 (100%)	0,342
	A/T	48 (85,7%)	8 (14,3%)	56 (100%)	
	T/T	13 (100%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		125 (88,7%)	16 (11,3%)	141 (100%)	
DHFR 317	A/A	44 (89,8%)	5 (10,2%)	49 (100%)	0,846
	A/G	61 (87,1%)	9 (12,9%)	70 (100%)	
	G/G	20 (90,9%)	2 (9,1%)	22 (100%)	
Ukupno		125 (88,7%)	16 (11,3%)	141 (100%)	

Tabela 34. Korelacija polimorfizama u svim ispitivanim genima sa EFS

Polimorfizmi		Ishod				Ukupno	Statistička značajnost (p)
		Živi	Recidiv	Smrt u recidivu	Toksična smrt		
TYMS 6bp	I/I	57 (81,4%)	4 (5,7%)	7 (10%)	2 (2,9%)	70 (100%)	0,835
	I/D	46 (75,4%)	8 (13,1%)	6 (9,8%)	1 (1,6%)	61 (100%)	
	D/D	15 (93,8%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,2%)	16 (100%)	
Ukupno		118 (80,3%)	12 (8,2%)	13 (8,8%)	4 (2,7%)	147 (100%)	
TYMS 28bp	3/3	40 (81,6%)	3 (6,1%)	4 (8,2%)	2 (4,1%)	49 (100%)	0,949
	3/2	47 (75,8%)	8 (12,9%)	6 (9,7%)	1 (1,6%)	62 (100%)	
	2/2	32 (86,5%)	1 (2,7%)	3 (8,1%)	1 (2,7%)	37 (100%)	
Ukupno		119 (80,4%)	12 (8,1%)	13 (8,8%)	4 (2,7%)	148(100%)	
MTHFR 677	C/C	56 (80%)	5 (7,1%)	8 (11,4%)	1 (1,4%)	70 (100%)	0,312
	C/T	53 (86,9%)	4 (6,6%)	3 (4,9%)	1 (1,6%)	61 (100%)	
	T/T	10 (58,8%)	3 (17,6%)	2 (11,8%)	2 (11,8%)	17 (100%)	
Ukupno		119 (80,4%)	12 (8,1%)	13 (8,8%)	4 (2,7%)	148 (100%)	
MTFHR 1298	A/A	57 (80,3%)	5 (7%)	6 (7,5%)	3 (4,2%)	71 (100%)	0,519
	A/C	47 (83,9%)	5 (8,9%)	3 (5,4%)	1 (1,8%)	56 (100%)	
	C/C	12 (66,7%)	2 (11,1%)	4 (22,2%)	0 (0%)	18 (100%)	
Ukupno		116 (80%)	12 (8,3%)	13 (8,9%)	4 (2,8%)	145 (100%)	
SLC19A1	G/G	35 (87,5%)	0 (0%)	4 (10%)	1 (2,5%)	40 (100%)	0,371
	G/A	49 (74,2%)	8 (12,1%)	7 (10,6%)	2 (3%)	66 (100%)	
	A/A	32 (82,1%)	4 (10,3%)	2 (5,1%)	1 (2,6%)	39 (100%)	
Ukupno		116 (80%)	12 (8,3%)	13 (9%)	4 (2,8%)	145 (100%)	
DHFR 680	A/A	12 (80%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)	15 (100%)	0,183
	C/A	52 (82,5%)	2 (3,2%)	7 (11,1%)	2 (3,2%)	63 (100%)	
	C/C	49 (77,8%)	9 (14,3%)	4 (6,3%)	1 (1,6%)	63 (100%)	
Ukupno		113 (80,1%)	12 (8,5%)	12 (8,5%)	4 (2,8%)	141 (100%)	
DHFR 675	A/A	63 (85,1%)	3 (4,1%)	6 (8,1%)	2 (2,7%)	74 (100%)	0,090
	A/G	41 (75,9%)	5 (9,3%)	6 (11,1%)	2 (3,7%)	54 (100%)	
	G/G	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		113 (80,1%)	12 (8,5%)	12 (8,5%)	4 (2,8%)	141 (100%)	
DHFR 556	T/T	62 (84,9%)	3 (4,1%)	6 (8,2%)	2 (2,7%)	73 (100%)	0,098
	T/C	42 (76,4%)	5 (9,1%)	6 (10,9%)	2 (3,6%)	55 (100%)	
	C/C	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		113 (80,1%)	12 (8,5%)	12 (8,5%)	4 (2,8%)	141 (100%)	
DHFR 464	A/A	62 (86,1%)	2 (2,8%)	6 (8,3%)	2 (2,8%)	72 (100%)	0,029
	A/T	42 (75%)	6 (10,7%)	6 (10,7%)	2 (3,6%)	56 (100%)	
	T/T	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (100%)	
Ukupno		113 (80,1%)	12 (8,5%)	12 (8,5%)	4 (2,8%)	141 (100%)	
DHFR 317	A / A	36 (73,5 %)	8 (16, 3%)	4 (8,2%)	1 (2%)	49 (100%)	0,309
	A/G	59 (84,3%)	2 (2,9%)	7 (10%)	2 (2,9%)	70 (100%)	
	G/G	18 (81,8%)	2 (9,1%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)	22 (100%)	
Ukupno		113 (80,1%)	12 (8,5%)	12 (8,5%)	4 (2,8%)	141 (100%)	

4.18. Korelacija varijanti u ispitivanim genima sa OAS

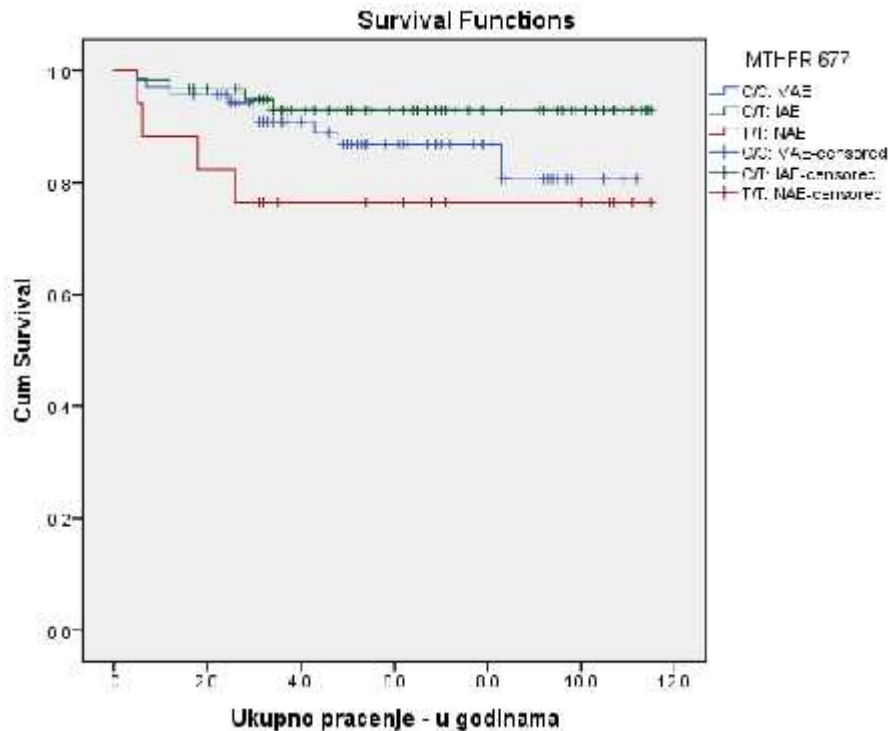
Povezanost varijanti u ispitivanim genima sa ukupnim preživljavanjem je predstavljen zasebno, pomoću Kaplan-Meier kriva.

Varijanta A/C u genu za *MTHFR* c.677 korelira sa najvećim procentom preživljavanja (Grafikon 43), dok je u istom genu ta povezanost višena kod c.1298 A/C polimorfizma (Grafikon 44).

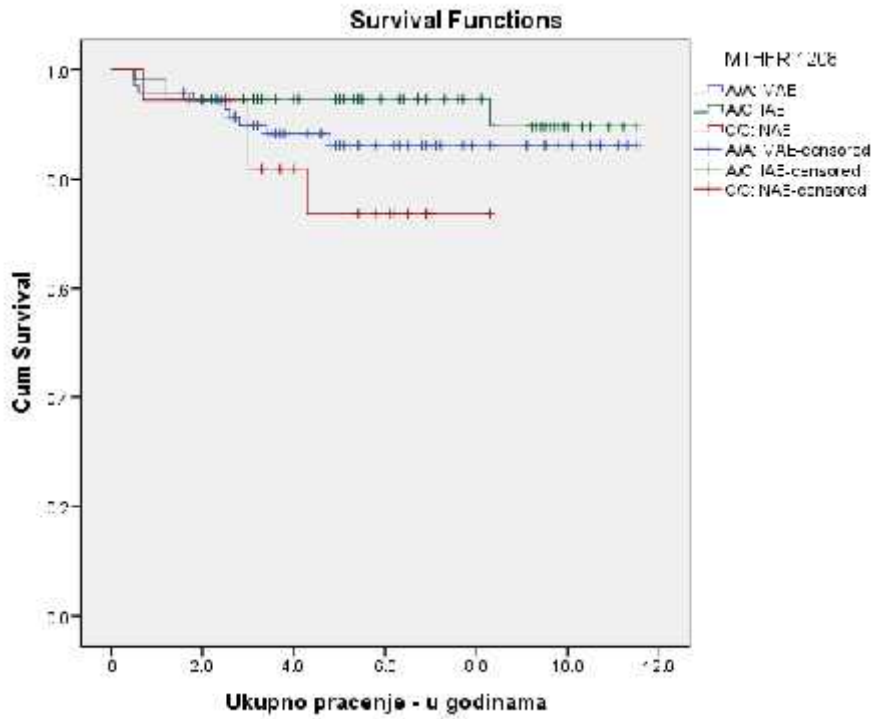
Varijante 6bp D/D (Grafikon 45) i 28bp 2/2 (Grafikon 46) u genu za *TYMS* koreliraju sa boljim preživljavanjem.

Polimorfizam A/A u c.80 *SLC19A1* je povezan sa boljim OAS (Grafikon 47).

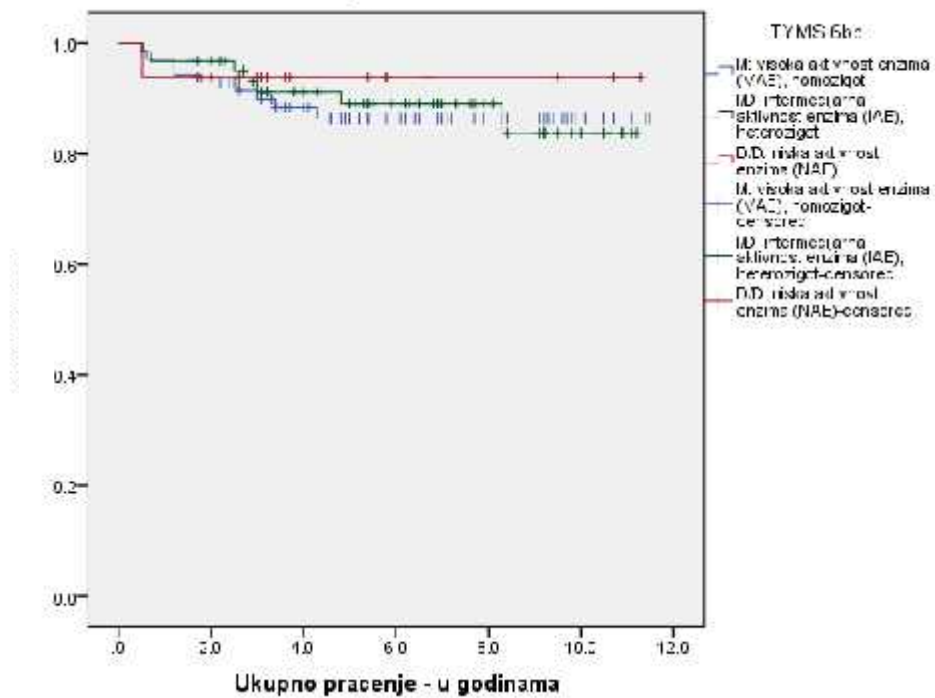
Varijante u genu za *DHFR* koje koreliraju sa većim procentom preživljavanja su: C/C u -680 (Grafikon 48), G/G u -675 (Grafikon 49), C/C u -556 (Grafikon 50), T/T u -464 (Grafikon 51) i G/G u -317 (Grafikon 52).



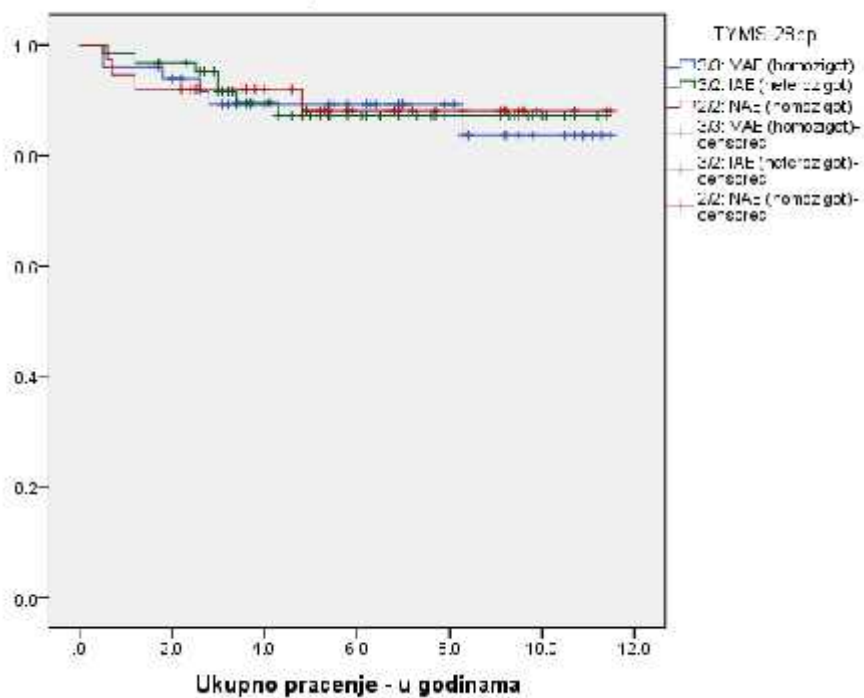
Grafikon 43. OAS u odnosu na varijante u c.677 *MTHFR*



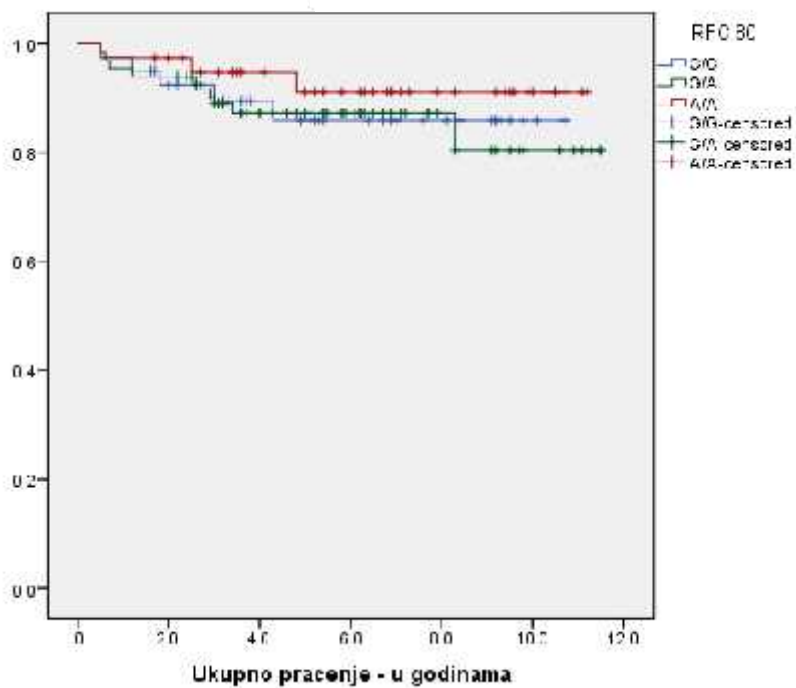
Grafikon 44. OAS u odnosu na varijante u c.1298 *MTHFR*



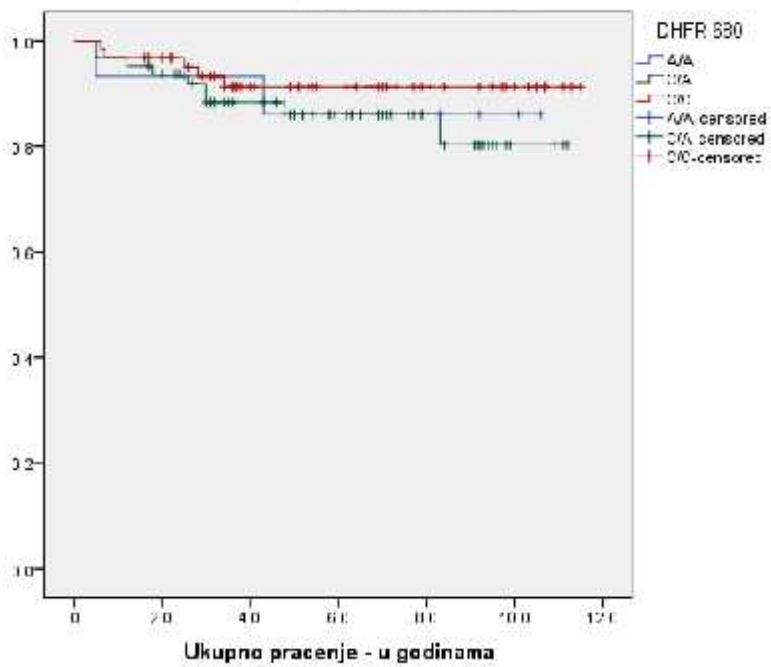
Grafikon 45. OAS u odnosu na varijante u 6bp *TYMS*



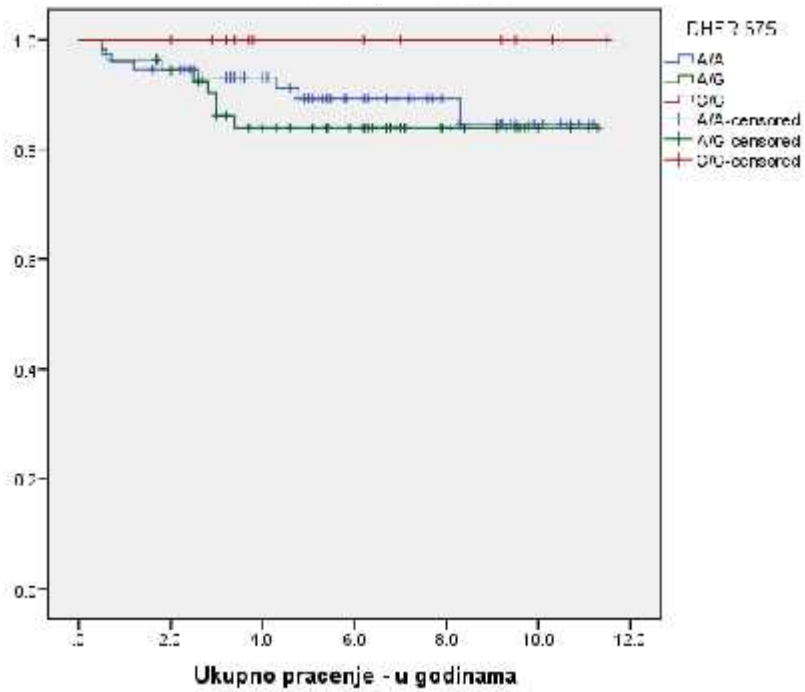
Grafikon 46. OAS u odnosu na varijante u 28bp *TYMS*



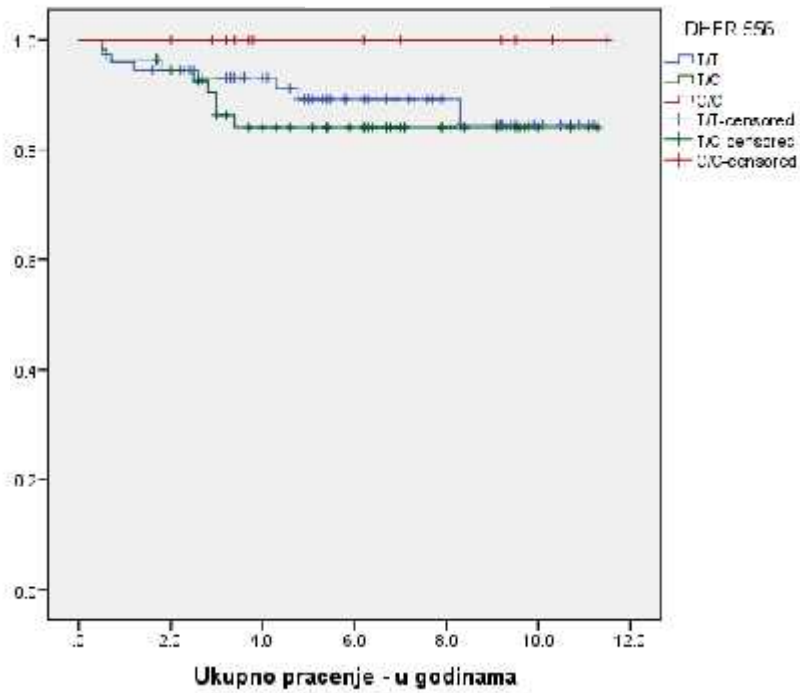
Grafikon 47. OAS u odnosu na varijante u c.80 *SLC19A1 (RFC80)*



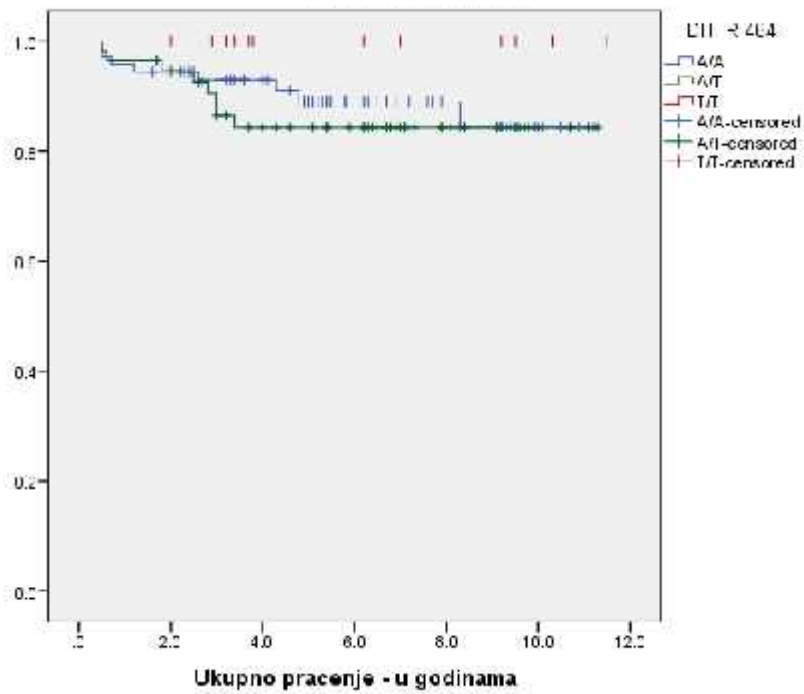
Grafikon 48. OAS u odnosu na varijante u -680 *DHFR*



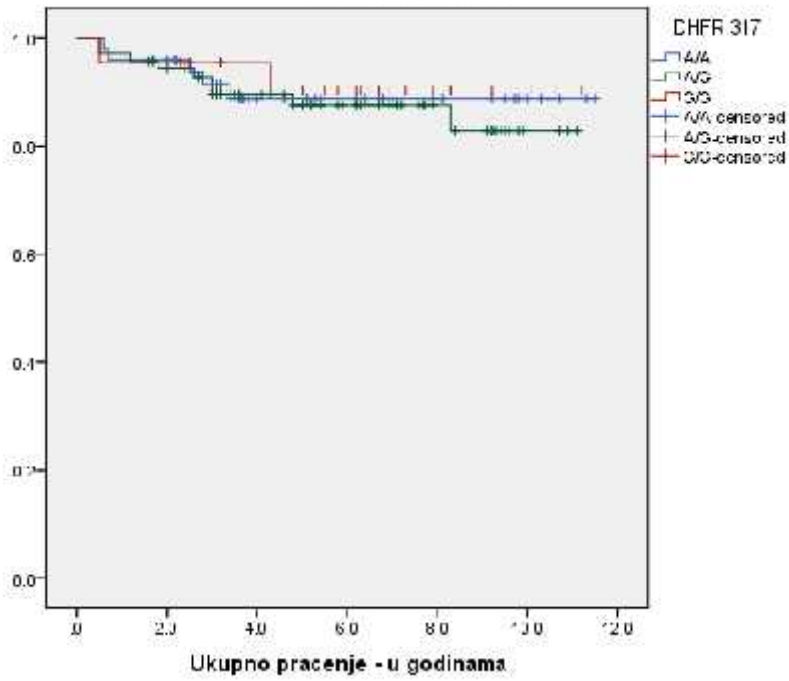
Grafikon 49. OAS u odnosu varijante -675 u *DHFR*



Grafikon 50. OAS u odnosu na varijante u -556 *DHFR*



Grafikon 51. OAS u odnosu na varijante u -464 *DHFR*



Grafikon 52. OAS u odnosu na varijante u -317 *DHFR*

5. DISKUSIJA

Maligne bolesti u dece su retke i čine svega 1% kancera u odraslih (92). ALL je najčešći i malignitet u pedijatriji, što nije jedini razlog zbog čega se najveći broj ispitivanja upravo sprovodi u ovoj grupi pacijenata. Naime, brojni radovi su ukazali na značaj razumevanja leukemogeneze u cilju modifikacije terapije, usmerene na genetskom profilu bolesnika. Nove terapijske opcije za decu sa refrakternom/rezistentnom bolešću predstavljaju veliki klinički i naučni izazov (93). Istraživanja nisu samo usmerena ka etiopatogenezi i novim terapijskim opcijama: veliki broj autora se bavi praćenjem neželjenih efekata primenjenih lekova i njihove potencijalne predikcije (94). Toksičnost hemioterapije predstavlja jedan od bitnih problema koji utiče na tok lečenja i preživljavanje dece sa ALL.

Studijska grupa je obuhvatila 161 dete sa *de novo* dijagnostikovanom ALL u periodu od 10 godina. Primećena je dominacija muškog pola, što je podatak koji drugi autori prijavljuju u uzrastu preko 10 godina (95). Pik javljanja ALL u naših pacijenata u predškolskom uzrastu odgovara podacima iz literature. Takođe, brojni autori prijavljuju najmanju učestalost ALL u odojaskom periodu, kao što je viđeno i u našoj grupi bolesnika (96).

Standardnom dijagnostikom, koja je jasno determinisana u protokolu lečenja, dobijeni su podaci o karakteristikama ALL u naših ispitanika. Klasifikacija po FAB-u je pokazala laku dominaciju L2 morfološkog tipa blasta (55,9%), što ne odgovara podacima drugih autora, koji navode dominaciju L1 tipa (10). Međutim, klasifikacija po FAB-u danas ima istorijski značaj (97), jer se uvođenjem novih prognostičkih parametara na genetskom nivou značajno unapredila stratifikacija rizika. Imunofenotipski profil bolesnika u našoj studiji odgovara podacima u literaturi, gde se takođe navodi značajno povećana zastupljenost B-ćelijske ALL (98). Inicijalna infiltracija CNS-a, kao najčešća propagacija ekstramedularne bolesti je viđena u vrlo malom broju pacijenata, što se takođe podudara sa rezultatima drugih studija (99). Genetski rearanžmani, određeni konvencionalnom citogenetikom i molekularno-genetskim analizama, od značaja za stratifikaciju rizika i primenu usmerene terapije, detektovani su u uobičajenom procentu u našoj grupi ispitanika (100), što prijavljuju i brojni drugi autori (101, 102).

Odgovor na terapiju naših ispitanika: određivanje ABB 8. dana terapije, procenat blasta u mijelogramu 15. dana, kao i kvantifikacija blasta merena FC iz istog uzorka i procena morfološke i molekularne remisije 33. dana lečenja su komplementarni sa literaturnim podacima (103). Osim u deca koja su imala ranu indukcionu toksičnu smrt, svi ostali pacijenti su ušli u remisiju bolesti. U odnosu na jasno determinisane navedene parametre, uz inicijalne prognostičke faktore, izvršena je stratifikacija rizika, čija distribucija odgovara podacima drugih autora (98). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su kliničke i laboratorijske karakteristike deca obolele od ALL na dijagnozi u saglasju sa podacima iz literature (104).

Komparacija analiziranih genetičkih varijanti u genima koji kodiraju enzime koji učestvuju u metabolizmu MTX u obolele deca i u kontrolnoj grupi nije ukazala na razliku u učestalosti. Ovakav zaključak oponira pretpostavku da određeni polimorfizmi učestvuju u leukemogenezi, ali su oprečni rezultati dobijeni u studijama koje su sprovedene u adultnih pacijenata sa ALL (105). Povišena stopa mutacija i deregulacija ekspresije određenih gena u ćelijama mogu povećati rizik za nastanak neoplastičnih promena. Folatni put u ćelijama je izuzetno važan za procese sinteze DNK i DNK metilacije. Genetičke varijante koje modulišu ove procese, mogu modulirati i rizik za nastanak malignih oboljenja. Neke od ispitanih genetičkih varijanti se dovode u vezu sa oštećenjima DNK, pa je mogući njihov doprinos u razvoju malignih bolesti, kakva je dečja ALL. U literaturi se nalaze kontraverzni rezultati i u istraživanjima sprovedenih u deca sa ALL, gde jedni autori navode da određeni polimorfizmi koreliraju sa nastankom ALL (57), dok drugi tvrde da iste genetičke varijante imaju protektivnu ulogu i ne dovode do razvoja bolesti (106). Studija koja je obuhvatila najveći broj ispitanika je pokazala da prisustvo varijantnog, *MTHFR* c.677T alela, blago smanjuje rizik za pojavu ALL. Varijacija *MTHFR* c.1298 A>C u ovom slučaju nije pokazala asocijaciju sa nastankom ALL (56). Manje funkcionalni *MTHFR* aleli kodirani c.677T alelom sporije prevodi 5,10-metilen-THF u 5-metil-THF, što ostavlja više slobodnog 5,10-metilen-THF za sintezu dTMP od dUMP. Na ovaj način se smanjuje stopa ugrađivanja uracila u DNK, što predstavlja oštećenje DNK i samim tim se smanjuje verovatnoća za razvoj maligne bolesti (57). Za varijante koje povećavaju ekspresiju gena *TYMS* bi se očekivalo da smanjuju rizik od nastanka malignih bolesti, jer visoko ekspimirani gen *TYMS* smanjuje koncentraciju

deoksiuridinskih nukleotida koji mogu da oštete DNK. Me utim, studije koje su analizirale ponovke od 28bp u genu *TYMS* pokazale su opre ne rezultate. Naime, pove an rizik za razvijanje ALL je pokazan i za varijantu sa 3 ponovka (107) i za varijantu sa 2 ponovka od 28bp u genu *TYMS* (78). Ve a aktivnost enzima DHFR, klju nog enzima folatnog puta, i visok nivo unosa folata u eliju RFC1 transporterom su povezani sa visokim nivoom aktivnih formi folata u eliji, što omogu ava efikasnu sintezu dTMP-a iz dUMP i adekvatan nivo metilacije DNK. O ekivalo bi se, stoga, da varijante u ovim genima koje uslovljavaju visoku aktivnost ovih proteina budu povezane sa smanjenim rizikom od razvoja ALL. Zaista, izu avaju i varijacije u genu *DHFR* kod ALL pacijenta i u kontrolnoj grupi, pokazana je protektivna uloga alela koji uslovljava ve u ekspresiju gena *DHFR* (108). Me utim, opre ni rezultati su dobijeni što se ti e *SLC19A1* c.80 G>A varijacije i rizika za dobijanje ALL. Naime, u jednoj studiji je pokazano da je rizik za nastanak ALL zna ajno povišen kod dece koja nose *SLCIA1* c.80AA genotip (78), dok je u drugoj studiji pokazano da je ovaj genotip povezan sa smanjenim rizikom za nastanak ALL (79). U studiji koja je sprovedena u našoj populaciji, a koja je ispitivala u estalost varijanti u *MTHFR* genu kod pacijenata sa trombofilijom tako e nije ukazala na razliku izme u obolelih i zdravih osoba kao kontrolne grupe (109).

Geni *TYMS*, *MTHFR* i *DHFR* kodiraju enzime folatnog puta i *SLC19A1* kodira transporter folata i MTX. Kod pedijatrijskih pacijenata sa ALL i u kontrolnoj grupi je detektovano ukupno 11 geneti kih varijacija u ova 4 gena. U našoj grupi obolele dece, alelska distribucija je bila vrlo sli na u pore enju sa rezultatima dobijenim na kontrolnoj grupi ispitanika. Tako e, zastupljenost alela u pomenuta etiri gena me u našim ispitanicima je bila sli na kao za ispitanike drugih evropskih populacija (110).

Korelacija geneti kih varijanti sa inicijalnim parametrima prognoze je ukazala na nekoliko zna ajnih rezultata. Kada se ispita prose an uzrast bolesnika na dijagnozi, uvi a se da su deca sa 6bp D/D varijantom u genu za *TYMS* zna ajno starija od dece sa drugim polimorfizmima. Istraživanja drugih autora ukazuju na korelaciju sa polom, ali ne i uzrastom, zbog ega rezultati naše studije doprinose razumevanju distribucije i uloge detektovanih geneti kih varijanti (111). U naših ispitanika je pokazana korelacija *DHFR* varijanti -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T sa B- elijskim imunofenotipom i *MTHFR*

c.1298 A>C sa T-ALL. Povezanost različitih genetičkih varijanti sa imunofenotipom je opisana u literaturi: pokazano je da *SLC19A1* gen ima veću kapacitet za vezivanje MTX kod dece sa B- limfocitnom u poređenju sa T- limfocitnom ALL (112). U ovom istraživanju je višestruka i korelacija genetičkih varijanti u *TYMS* genu sa kompleksnim kariotipom u dece sa ALL. Slični podaci su objavljeni i od strane drugih autora: deca sa t(12;21), kod kojih je višestruka povišena ekspresija *SLC19A1* gena su razvila veću rezistenciju na MTX (113). Pacijenti sa više genetičkih rearanžmana mogu da imaju manju akumulaciju MTX poliglutamata, što bitno menja odgovor na terapiju i ukazuje na značaj individualnog genetskog profilisanja.

Uinjerno je poređenje genetičkih varijanti u odnosu na odgovor na terapiju, u različitim vremenskim intervalima, što ukazuje na povezanost polimorfizama sa brzinom ulaska u CR. Višestruka je značajna korelacija varijanti 6bp i 28 bp u genu za *TYMS* i varijanti -680 C>A i -317 A>G u genu za *DHFR* sa sporijom kinetikom blata 15. dana lečenja, procenjeno morfološkim pregledom koštane srži. Drugi autori takođe navode da varijante u genu za *DHFR* koreliraju sa lošijim odgovorom na terapiju, što pripisuju povećanoj ekspresiji gena i prisustvu određenih haplotipova koji asociraju sa većom rezistencijom na primenjene lekove (114). Takođe, u literaturi je pokazana rezistencija leukemijski izmenjenih limfocita kod zbirnog prisustva polimorfizama u genima *DHFR*, *SLC19A1* i *TYMS* (113).

Metabolički put folata/MTX uključuje veliki broj enzima i transportera. Većina dosadašnjih studija je uključivala mali broj pacijenata i analizirao se jedan do nekoliko genetičkih varijanti koje modulišu odgovor na terapiju MTX. Primenom sekvenciranja druge generacije moguće je za kratko vreme ispitati veliki broj genetičkih varijanti. Ovaj pristup je već našao primenu u ispitivanju asocijacije između u farmakokinetike MTX i varijacija u genima za transportere kod dece obolele od ALL (115, 116). Velike multicentrične studije predstavljaju odličan pristup za identifikaciju genetičkih varijanti koje mogu da modulišu složene metaboličke puteve, kakav je put MTX.

Uсталost, manifestacija i stepen toksičnosti MTX kod pacijenata u našoj studiji odgovara podacima iz literature (117). Pokazano je da je više od 2/3 dece ispoljilo neželjene efekte primene MTX, od kojih dečaci značajno češće, ali oni čine i veću procenat ispitanika u studiji. Višestruko je da procenat i stepen toksičnosti raste sa

ponavljanim ekpozicijama MTX u starije dece, prose nog uzrasta od 10 godina. Savremeni radovi ukazuju da adolescenti zaslužuju poseban pristup, upravo zbog veće podložnosti neželjenim efektima terapije (118). Klinička manifestacija neželjenih efekata MTX je bila ubedljivo dominantnija u odnosu na laboratorijsku.

Protektivni efekat varijante c.677 T/T u *MTHFR* genu u ispoljavanju toksičnosti tokom parenteralne primene MTX u dozi od 2 g/m^2 se može objasniti niskom aktivnošću enzima u *MTHFR* genu, uzrokovanom homozigotnom c.677T varijantom koja dovodi do redukovane stepena konverzije 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metiltetrahidrofolat. Visok nivo 5,10-metilentetrahidrofolata olakšava *de novo* sintezu purina i timidilata, što dovodi do smanjenja toksičnih efekata MTX (58). Međutim, u literaturi se nalaze kontroverzni podaci vezani za predikciju toksičnosti MTX na osnovu prisustva ovog genotipa. Pojedini autori su objavili rezultate istraživanja gde ukazuju na upravo suprotan efekat, naglašavajući i da se u pacijenata sa ovim polimorfizmom češće javlja toksičnost tokom terapije MTX (119, 120). Interesantno je da je jedan od najcitiranijih radova koji je pokazao nepovoljan uticaj c.677T varijante *MTHFR* genu (121) doveden u pitanje ponovnom statističkom obradom rezultata objavljenog ispitivanja (116). Tako je dokazano da je ovaj polimorfizam povezan sa manjom toksičnošću u toku primene MTX, što je u saglasnosti sa rezultatima ovog istraživanja i odgovara podacima drugih studija (122). Iako je u najvećoj meri istražen uticaj *MTHFR* gena na toksičnost MTX, ispitivanje drugih gena koji kodiraju enzime koji učestvuju u metabolisanju leka pružaju takođe i kontradiktorne rezultate. U našoj grupi ispitanika, tokom primene drugog ciklusa MTX u dozi od 5 g/m^2 , polimorfizmi u genu za *SLC19A1* su imali različit uticaj: varijanta c.80 G/G je pokazala protektivni karakter, dok su deca sa varijantom c.80 A/A značajno češće ispoljila neželjene efekte leka. Kontroverzni stavovi u objavljenoj stručnoj literaturi se mogu objasniti različitom distribucijom nepovoljnih haplotipova koji utiču na status ispitivanih gena i sledstveno na ispoljavanje toksičnosti u toku primene MTX (123).

Korelacija farmakokinetike i farmakogenetike je od posebnog interesa. Najveći broj dece je ispoljio jednu epizodu usporenja kinetike leka tokom faze konsolidacije, nešto manji broj dece dve i najmanji broj dece tri epizode. Nijedno dete nije imalo produženu PK u sva četiri primenjena ciklusa MTX. Praćenje PK MTX je ukazalo da se

statisti ki zna ajno usporenje eliminacije leka registruje 48h od po etka primene u više od polovine ispitanika, a potom po u estalosti sledi 24h i zna ajno re e 36h i 42h. Produžena kinetika je pra ena do momenta kada nivo leka dostigne bezbednu koncentraciju u krvi. Najve i broj dece je imao kratkotrajno produženu ekskreciju leka, u trajanju od 24h, mada su mereni produženi nivoi i do 144h sata od po etka primene MTX. Mnogi autori ukazuju na zna aj individualne predikcije MTX toksivosti (124). Kada se posmatraju sva etiri primenjena ciklusa MTX zbirno, uvi a se da deca sa varijantom 6bp D/D u genu za *TYMS* imaju usporenu kinetiku leka. Me utim, kada se posmatraju pojedina ni ciklusi MTX, prime eno je da i drugi polimorfizmi koreliraju sa produženom kinetikom leka. Tokom primene 1. M su se izdvojile varijante c.1298 A/C i c.1298 C/C u genu za *MTHFR*, a u toku 3. M se prime uje produžena ekskrecija MTX kod varijante 6bp D/D u genu za *TYMS*, kao i kod varijanti -675, -556 i -464 u genu za *DHFR*. U toku primene 2. M i 4. M nijedan polimorfizam nije korelirao sa produženom kinetikom leka. PK MTX kod i ve a toksivost pri ponavljanim izlaganjima visokim dozama u pedijatrijskih pacijenata se objašnjava razli itim stepenom uticaja navedenih polimorfizama na farmakodinamiku ispitivanog leka (125). Interesantan je podatak u literaturi koji prijavljuje produženu farmakokinetiku MTX kada se primenjuju inhibitori protonske pumpe, ali takva korelacija nije vi ena u našoj grupi ispitanika (126).

Toksivost MTX je odavno prepoznata kao potencijalno životno ugrožavaju i doga aj tokom hemioterapije. Iz tog razloga su odavno formirani kriterijumi za jasnu identifikaciju i gradiranje toksivosti, u vidu internacionalnih vodi a (127), koji su danas integrisani u savremene protokole za le enje ALL u dece (128). U odnosu na CTC-NCI, koji je sastavni deo oba primenjena protokola u našoj grupi ispitanika (ALL IC-BFM 2002 i ALL IC-BFM 2009), ustanovljena je i gradirana toksivost tokom terapije MTX. U toku primene protokola mM (MTX u dozi od 2 g/m²), iji se neželjeni efekti sumarno prikazuju prema smernicama oba protokola, najve i broj dece je ispoljio gradus 1, potom gradus 2 i u najmanjoj meri gradus 3, dok nijedno dete nije ispoljilo gradus 4 toksivosti. Naši rezultati su u skladu sa podacima autora iz razvijenih zemalja, dok je u manje razvijenim zemljama procenat i gradus neželjenih efekata ve i (129). Od ispoljenih komplikacija, naj eš e je vi ena febrilna neutropenija, potom neželjeni efekti GIT-a, OM i hepatotoksivost, dok su neurotoksivost i nefrotoksivost najmanje bile zastupljene.

Kada se posmatraju pojedina ni ciklusi MTX, ordinirani u protokolu M, vrlo je sli no zastupljen gradus toksi nosti: tokom 1. M ciklusa najve i broj dece je ispoljio gradus 1, potom gradus 2 i u najmanjoj meri gradus 3, dok nijedno dete nije ispoljilo gradus 4. U nešto ve em procentu se registruju neželjeni efekti GIT-a. U toku primene 2. M gradus 3 se registruje samo kod hepatotoksi nosti, a raste procenat dece sa ispoljenom nefrotoksi noš u. Tokom ciklusa 3. M je vrlo sli na situacija u ispoljavanju tipa i gradusa toksi nosti sa prethodnim, sa izostankom neuroloških komplikacija, koji su u malom procentu bili prisutni u prethodna dva ciklusa. Pra enje neželjenih efekata primene MTX u toku 4. M je ukazao na rast gradusa i procenta dece sa toksi noš u GIT-a, dok je OM izostao kao komplikacija terapije. Ni u jednog deteta se tokom primene protokola M tako e nije registrovala toksi nost gradusa 4. Rezultati studija drugih autora ukazuju na sli nu distribuciju neželjenih efekata terapije MTX, sa naglaskom da se vi a ve a u ustalost neuroloških komplikacija, bilo kao posledica intratekalne (130), bilo sistemske primene leka (131). Tako e, ve a incidenca nefrotoksi nosti se prijavljuje u literaturi u odnosu na naše pacijente (132), koja je bila i tolikog intenziteta da je zahtevala zamenu bubrežne funkcije (133). U literaturi se nalaze podaci i o alergijskim reakcijama na MTX, što nijedno dete u našoj studiji nije ispoljilo (134). Jedan od pokušaja da se spre i hepatotoksi nost je primena biljnih preparata koji navodno uti u na regeneraciju hepatocita (135), što još uvek nije prihva eno od strane nau ne zajednice, niti implementirano u terapijske protokole. Izdvojeni su polimorfizmi koji su pokazali zna ajnu korelaciju sa toksi noš u MTX. Tokom primene 2. M i 4 M. varijanta 28bp u genu za *TYMS* je pokazala povezanost sa pojavom i ve im gradusom OM. U 4. M se tako e izdvojila varijanta -317 u genu za *DHFR* kao prediktivni faktor za ispoljavanje hepatotoksi nosti. Pretragom literature, ne nalaze se radovi koji ispituju korelaciju varijanti u genu za *TYMS* i *DHFR* sa tipom i intenzitetom neželjenih efekata terapije MTX, što ini rezultate naše studije jedinstvenim i korisnim u pružanju nove informacije o uticaju svih ispitanih polimorfizama na ukupnu toksi nosti tokom primene ovog leka. Obzirom da su varijante u genu za *MTHFR* najviše izu avane, drugi autori su negirali korelaciju polimorfizama u ovom genu sa OM i hepatotoksi noš u, što se poklapa sa rezultatima naše studije (136). Mogu nost predikcije odgovora na terapiju na osnovu

farmakogenetičkih markera predstavlja siguran način doziranja potencijalno vrlo toksičnog leka, kao što je MTX.

Pacijenti na terapiji HR blokovima su izuzeti iz poređenja sa ispitivanim polimorfizmima. Najmanji broj dece je primao ovaj modalitet terapije, što nije osnovni razlog izučavanja, ali se postavljalo pitanje statističke validnosti obradenih podataka. Glavni razlog zašto nisu korelirani ispitivani polimorfizmi sa toksičnošću u tokom primene HR blokova jeste što svaki blok podrazumeva primenu brojnih drugih lekova, od kojih svaki, nezavisno od MTX može da dovede do pojave neželjenih efekata. Blok HR-1 pored MTX podrazumeva primenu: Dexamethason, Vincristine, Cytarabine, Cyclophosphamide i L-asparaginase, blok HR-2. Dexamethason, Vindesine, Daunorubicin, Ifosfamide i L-asparaginase, dok se bloku HR-3 MTX ordinira samo intratekalno, uz sistemsku primenu: Dexamethason, Cytarabine, Etoposide i L-asparaginase. U toku su studije koje ispituju varijante u genima koji učestvuju u metabolizmu kortikosteroida i drugih navedenih citostatika, tako da je ispitivanje polimorfizama tokom sinergizma različitih lekova veliki izazov za farmakogenetiku u budućnosti (137).

Peroralna terapija MTX u fazi održavanja traje znatno duže od parenteralne u fazi konsolidacije, ali se primenjuje u daleko manjim dozama (20 mg/m^2), jednom nedeljno, tokom 13-18 meseci, zavisno od grupe rizika. Toksičnost tokom peroralne primene MTX se procenjuje preko parametara krvne slike i biohemije, gde se od najvažnije značajne funkcije jetre (hepatotoksičnost). U najvećem broju dece je registrovana hepatotoksičnost tokom terapije održavanja. Interesantno je da su znatno češće registrovane povišene vrednosti ALT u odnosu na AST. U odnosu na intenzitet toksičnosti najčešće je zabeležen gradus 1 i potom gradus 3. Kao i kod sistemske primene MTX, tako i tokom peroralne u terapiji održavanja, deca starijeg uzrasta su statistički znatno više ispoljila neželjene efekte terapije u odnosu na mlađe ispitanike. Ova pojava i mehanizam su već objašnjeni u prethodnim poglavljima. Takođe je zanimljivo da tokom terapije održavanja grupa rizika nije uticala na pojavu i stepen toksičnosti. Moglo bi se očekivati da deca koja su prethodno bila izložena intenzivnijoj terapiji imaju veću procenat neželjenih efekata u završnoj fazi lečenja, ali to u našoj studiji nije pokazano. Varijante u genima *MTHFR*, *DHFR*, *SLC19A1* i *TYMS* se nisu pokazale prediktivnim tokom primene peroralnog MTX. Mogući razlog je da su u pitanju znatno manje doze

koje se primenju peroralno u odnosu na one koja su deca primala parenteralno. Iako je prili an broj dece ispoljio hepatotoksi nost, nije pokazana korelacija sa ispitivanim polimorfizmima. Autori drugih studija, dostupnih u literaturi se nisu bavili izu avanjem povezanosti varijantama u genima koji kodiraju enzime koji u estvuju u metabolizmu MTX tokom peroralne primene, tako da naša studija nudi podatak o negativnoj korelaciji. Postoje brojni radovi koji izu avaju oralnu i subkutanu primenu MTX, ali se radi o pacijentima sa drugim bolestima kao što su: juvenilni idiopatski artritis (138), psorijaza (139), inflamatorne bolesti creva (*Crohn*) (140), vaskulitisi (*Takayasu* arteritis) (141), bolesti vezivnog tkiva (eozinofilni fasciitis) (142). Zbog kontinuirane primene drugog leka u terapiji održavanja (6-Mercaptopurine), za koji su ve izdvojeni polimorfizmi od zna aja, ispitana je incidenca varijanti 460 i 719 u genu za tiopurin-metiltransferazu (*TPMT*), gde je vi en pozitivan heterozigotni ili homozigotni status u izrazito malom broju dece. Istražena je i povezanost ispitivanih polimorfizama sa varijantama u *TPMT* genu, gde nije na ena unakrsna korelacija. Zanimljivo je što u delovanju lekova 6-MP i MTX postoji sinergizam. Naime, MTX inhibira enzim XO, u esnika metaboli kog puta tiopurinskih lekova, direktno se vezuju i za ovaj enzim, i tako pove ava dostupnost 6-MP. Osim toga, inhibiraju i DHFR enzim, MTX smanjuje koncentraciju aktivnih formi folata, što uti e na smanjenje koncentracije SAM-a, kofaktora koji stabilizuje *TPMT* enzim. I na ovaj na in MTX pove ava citotoksi ni potencijal samog 6-MP. Na kraju, i jedan i drugi lek inhibiraju sintezu purina, 6-MP preko svojih metilovanih metabolita, a MTX direktno, inhibiraju i enzim AICAR transformilazu i indirektno, smanjuju i dostupnost neophodnih formi folata (143).

U disertaciji je prikazan OAS u dece sa ALL od 87%, što je rezultat vrlo blizak procentu izle enja u razvijenim zemljama koji iznosi 90% (39). EFS je zabeležen u 80,6% dece, od kojih je 15% razvilo recidiv osnovne bolesti, 1,3% sekundarni malignitet, a u 3,1% je konstatovana toksi na smrt. To su, tako e, podaci koji odgovaraju rezultatima drugih autora koji primenjuju savremene protokole le enja za decu sa ALL (144). Prime eno da je stariji uzrast bolesnika povezan sa toksi nom smr u, što je prethodno ve detaljno objašnjeno u smislu da su daleko podložniji toksi nosti od mla e dece. O ekivano, pokazana je statisti ki zna ajna razlika u preživljavanju u odnosu na grupe rizika u OAS i EFS, što je tako e u saglasju sa literaturnim podacima (145).

U našoj grupi ispitanika je značajno veći i broj dece imao smrtni ishod usled recidiva, nego zbog toksikoznosti terapije, što odgovara i rezultatima drugih autora (146). To je jedan od glavnih razloga zašto su brojne studije usmerene ka identifikaciji faktora rizika za razvoj recidiva bolesti i eventualnu prevenciju (147-149). To je, takođe, bio jedan od glavnih ciljeva i našeg istraživanja. Ova studija nije pokazala da prisustvo ispitivanih genetičkih varijanti direktno utiče na procenat izlječenja, ali je ukazala na potencijalno loš faktor prognoze u dece sa -464 T/T varijantom u *DHFR* genu, koja su značajno češće razvila recidiv ALL, što su u skorašnjim radovima objavili i drugi autori (150). U našoj grupi ALL pacijenata, identifikovano je 11% nosilaca *MTHFR* c.677TT genotipa, koji se povezuje sa smanjenom aktivnošću u *MTHFR* enzima. Pacijenti sa ovim genotipom imaju veću u verovatnoću da razviju recidiv osnovne bolesti (58). Bolesnici koji su složeni heterozigoti za varijante *MTHFR* c.677T i c.1298C takođe imaju nisku aktivnost *MTHFR* enzima zbog čega su takođe u riziku od pojave recidiva. Rezultati naše analize haplotipova su potvrdili od ranije poznatu činjenicu (151) da se ove varijante, c.677T i c.1298C, koje menjaju aminokiselinski sastav *MTHFR* enzima retko nalaze na istom hromozomu. Nosilaca *MTHFR* c.677TT i složeni heterozigota za varijante c.677T i c.1298C u našoj grupi pacijenata je ukupno bilo 26%. Kod ovih pacijenata bi trebalo razmotriti intenzifikaciju doze MTX zbog potencijalne mogućnosti da razviju recidiv. Detektovano je oko 33% homozigotnih nosilaca alela sa 3 ponovka, 3R, u minisatelitskom lokusu 5'UTR-a gena *TYMS*. ALL pacijenti koji nose ovaj genotip imaju povećan rizik za razvoj recidiva (88), ali manji rizik od toksikoznosti izazvane MTX (83). U našoj grupi ispitanika, minisatelitski region u 5'UTR-u i 6bp indel u 3'UTR-u gena *TYMS* su bili u LD-u, što je poznato i za druge evropske populacije (87). Relativno redak haplotip definisan duplim ponovkom (2R) i delecijom od 6bp (6bp-), zastupljen je sa 8.2% kod naših ispitanika. Pregledom literature se nalazi podatak da je ovaj haplotip doveden u vezu sa smanjenim rizikom od recidiva kod pedijatrijskih pacijenata sa ALL (88). Na osnovu prisutnosti varijanti u genu *TYMS*, možemo zaključiti da u srpskoj populaciji ima oko 33% pacijenata koji su kandidati za intenzifikaciju doznog režima MTX, dok za oko 8% pacijenata treba razmotriti smanjenje doze ovog leka. U našoj studiji je detektovano 5 varijacija u promotoru gena *DHFR*. Ovih 5 varijacija su u izraženom LD-u, tako da smo među našim ispitanicima detektovali samo 4 relativno

u estala haplotipa. Jedna od varijacija u genu *DHFR* koja je analizirana u našoj studiji, *DHFR* -317 A>G, se dovodi u vezu sa odgovorom na terapiju MTX (67, 71). Međutim, i genotip *DHFR* -317GG (71) i genotip *DHFR* -317AA (67) su dovedeni u vezu sa povećanom šansom za razvoj recidiva kod dece sa ALL. Genotip *DHFR* -317GG je u našoj grupi ispitanika imao uestalost oko 15%, dok je genotip *DHFR* -317AA imao uestalost od oko 35%. Budući da je uestalost navedenih genotipova dosta visoka u belim populacijama, vredelo bi sprovesti studiju kojom bi se utvrdilo koji od genotipova SNV *DHFR* -317 A>G pozitivno, odnosno negativno utiče na ishod bolesti. U genu *SLC19A1* analizirali smo klinički najrelevantniju varijaciju, *SLC19A1* c.80 G>A. U našoj grupi pacijenata genotip c.80AA, povezan sa smanjenom aktivnošću u RFC1 transportera (74), bio je zastupljen sa oko 27%. Pedijatrijski pacijenti sa ALL koji nose ovaj genotip imaju lošiju prognozu, verovatno zbog smanjenog unosa MTX u maligno alterisane ćelije (75, 80). Za nosioce c.80AA genotipa kod kojih MTX manje efikasno prodire u leukemijsku ćeliju, veća doza ovog leka bi mogla da poboljša ishod lečenja. Takođe, ukoliko dođe do neželjenih efekata MTX, nosiocima c.80AA genotipa bi možda trebalo povećati dozu prirodnog folata, 5-formil-THF-a, da bi se smanjio toksični efekat leka.

Leukemogeneza je dinamičan proces, koji uslovljava tok bolesti kontinuiranim promenama u populaciji malignih ćelija. Zahvaljujući uvođenju molekularne genetike u kliničku dijagnostiku, detektuje se i prati varijabilnost malignih ćelija, odgovorna za visoko proliferativne, agresivne i rezistentne subklonove. Od velikog je značaja identifikacija potencijalnih genetičkih markera koji doprinose izraženoj toksičnosti hemioterapije, na koje se može uticati smanjenjem doze leka ili onih koji utiču na nedovoljan metabolizam leka i dovode do recidiva bolesti, a samim tim i lošijeg preživljavanja dece sa ALL (152).

6. ZAKLJU CI

U skladu sa postavljenim ciljevima disertacije, a na osnovu dobijenih rezultata, izvedeni su slede i zaklju ci:

1. Istraživanje je ukazalo da ne postoji razlika u uestalosti ispitivanih geneti kih varijanti u genima za *MTHFR*, *DFHR*, *SLC19A1* i *TYMS* izme u dece obolele od ALL i zdravih osoba i da je alelska distribucija vrlo sli na izme u pacijenata i kontrolne
2. Uo ena je niska incidenca nepovoljnih genotipova u našoj populaciji i prikazani su naj eš i haplotipovi ispitivanih gena i pokazano je da zastupljenost alela u pomenuta etiri gena me u našim ispitanicima odgovara drugim evropskim populacijama
3. Uticaj pola na u estalost detektovanih polimorfizama u navedenim genima nije notiran, ali je pokazano sa statisti ki zna ajnom validnoš u da deca kod kojih je detektovan *TYMS* 6bp D/D polimorfizam u starijem uzrastu obolevaju od ALL u odnosu na druge varijante u istom genu
4. U odnosu na imunofenotipske karakteristike, pokazana je statisti ki zna ajna razlika me u ispitivanim genima: *MTHFR* c.1298 A>C korelira sa manje povoljnim, T- elijskim imunofenotipom, dok se *DHFR* varijante -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T detektuju isklju ivo u dece sa B- elijskom ALL
5. Uo ena je statisti ki zna ajna korelacija geneti kih varijanti u *TYMS* genu sa kompleksnim kariotipom u dece sa ALL
6. Vi ena je statisti ki zna ajna povezanost varijanti 6bp i 28 bp u genu za *TYMS* i varijanti -680 C>A i -317 A>G u genu za *DHFR* sa sporijom kinetikom blasta 15. dana le enja
7. Statisti ki zna ajno eš e se detektovala klini ka i laboratorijska toksi nost MTX u starijem uzrastu ispitanika, prose no u desetoj godini života
8. Pra enje farmakokinetike je pokazalo da je najve i broj dece imao produženu kinetiku leka tokom jednog od etiri ciklusa MTX, u statisti ki zna ajno manjem

procentu tokom dva i tokom tri ciklusa, a da se ni u jednog deteta nije javilo usporenje ekskrecije leka u sva četiri ciklusa

9. Produžena kinetika MTX se ubedljivo najčešće detektovala u 48h od početka primene MTX, kod najvećeg broja ispitanika je trajala 24h, ali su u izuzetno malom procentu dece mereni povišeni nivoi leka i do 144h
10. Korelacijom farmakokinetike i farmakogenetike u naših bolesnika pokazano je da su deca sa *TYMS* 6bp D/D varijantom statistički značajno češće imala povišene nivoe MTX
11. Deca kod kojih su se ispoljila neželjena dejstva parenteralne primene MTX su u najvećem broju imala nizak stepen toksikoznosti, statistički značajno najzastupljeniji je bio gradus 1
12. Višenamerno je statistički značajan protektivni efekat varijante c.677 T/T u *MTHFR* genu u bolesnika koji su primali MTX u dozi od 2 g/m²: deca sa tim polimorfizmom su najređe ispoljavala neželjene efekte leka
13. Takođe, deca sa genotipovima *MTHFR* c.1298 C/C, *DHFR* -675 G/G, -556 C/C i -464 T/T i *SLC19A1* c.80 A/A vremenom ispoljavaju veći stepen toksikoznosti MTX pri ponavljanim ekpozicijama većim dozama leka (5 g/m²), što se takođe pokazalo statistički značajnim
14. Utvrđeno je da se hepatotoksikoznost javlja u većem procentu tokom peroralne primene MTX u fazi održavanja u odnosu na parenteralnu primenu leka u fazi konsolidacije, da se statistički značajno češće registruju povišene vrednosti ALT u odnosu na AST i da je u najvećem broju dece zabeležen gradus 1 i gradus 3 hepatotoksikoznosti
15. Ukupno preživljavanje ispitanika u studiji (OAS) je iznosilo 87%, a EFS 80,6%: recidiv osnovne bolesti je razvilo 15% pacijenata, sekundarni malignitet je dijagnostikovao u 1,3% bolesnika, a u 3,1% dece je konstatovana toksikozna smrt
16. Jasno su definisani i prikazani različiti faktori koji utiču na prognozu, među kojima se izdvojila varijanta -464 T/T u *DHFR* genu, jer se pokazalo da su deca sa tim genotipom značajno češće razvila recidiv osnovne bolesti što je u toj grupi bolesnika uticalo na nepovoljan krajnji ishod lečenja

7. LITERATURA

1. Pui CH: Childhood leukemias. *N Engl J Med* 1995; 332 (24):1618-1630.
2. Silverman LB, Sallan SE: Acute lymphoblastic leukemia. Nathan and Oski's Hematology of infancy and childhood. Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT. Saunders 2003; Vol 2. p:1135-1156.
3. Greaves M: Childhood leukemia. *BMJ* 2002; 342(7332):283-287.
4. Pui CH: Acute lymphoblastic leukemia. Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ et al: Williams Hematology, 7th edition. McGraw Hill Medical, 2006; p:1321-1342.
5. Kustanovich AM, Savitskaja TV, Bydanov OI et al: Aberrant expression of tumor suppressor genes and their association with chimeric oncogenes in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2005; 29:1271-1276.
6. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ et al: Childhood Acute Lymphoblastic leukemia in the age of genomics. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46:570-578.
7. Harrison CJ: The genetics of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Baillieres Best Clin Haematol* 2000; 13(3):427-439.
8. Look AT: Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278(5340):1059-64.
9. Olney HJ, Gozzeti A, Rowley JD: Chromosomal abnormalities in childhood hematologic malignant disease. Nathan and Oski's Hematology of infancy and childhood. Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT. Saunders 2003; 2:1101-1134.
10. Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG: Acute lymphoblastic leukemia. Pizzo PA, Poplack DG: Principles and practice of pediatric oncology, 5th edition. Lippincott Williams and Wilkins, 2006; p:538-590.
11. Greaves M: Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer*, 2000; 35 (14):1941-1953.
12. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG et al: Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. Vol NIH Pub. No. 99-4649. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1999.

13. Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ et al: International incidence of childhood cancer, IARC Scientific Publications No. 87. Lyon, IYRC, 1988.
14. Hewitt D: Some features of leukemia mortality. *Br J Prev Soc Med* 1955; 9:81-88.
15. Greaves MF, Colman SM, Beard MEJ et al: Geographical distribution of acute lymphoblastic leukemia subtypes: Second report of the Collaborative Group Study. *Leukemia* 1993; 7:27-34.
16. Bhatia S, Robinson LL: Epidemiology of leukemia in childhood. Nathan and Oski's Hematology of infancy and childhood. Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT. Saunders 2003; Vol 2. p:1081-1100.
17. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC et al: Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 118-145.
18. Shaw MT: The cytochemistry of acute leukemia: A diagnostic and prognostic evaluation. *Semin Oncol* 1976; 3:219-228.
19. Benett JM, Catovsky D, Daniel MT et al: Proposals for the classification of the acute lymphoblastic leukemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Hematol* 1976; 33:451-458.
20. Pui CH, Behm FG, Crist WM: Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82:343-362.
21. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, Silvestri D, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5168-74.
22. Harrison CJ. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev.* 2001;15(1):49-59.
23. Chessells JM, Swansbury GJ, Reeves B et al: Cytogenetics and prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia: results of MRC UKALL X. *Br J Hematol* 1997; 99:93-100.
24. Olde Nordkamp L, Mellink C, van der Schoot E, van den Berg H. Karyotyping, FISH, and PCR in acute lymphoblastic leukemia: competing or complementary diagnostics? *J Pediatr Hematol Oncol.* 2009; 1(12):930-5.

25. Look AT, Aplan PD. Molecular and genetic basis of childhood cancer (Eds) Pizzo AP and Poplack DG, 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott company, 2006: 38-85.
26. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2318-57.
27. Cazzaniga G, Biondi A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica*. 2005;90(3):382-90.
28. Pui C-H. Treatment of acute leukemias : new directions for clinical research. Totowa, N.J.: Humana Press; 2003. p: 537-547
29. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96(8):2691-6.
30. Hoelzer D, Gokbuget N, Ottmann O et al: Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 162-192.
31. Pui CH: Central nervous system disease in acute lymphoblastic leukemia: prophylaxis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 142-146.
32. Gadner H, Masera G, Schrappe M et al: The eighth international childhood acute lymphoblastic leukemia workshop report. *Leukemia* 2006; 20:9–17.
33. Attarbaschi A, Mann G, Dworzak M et al: Treatment results in childhood lymphoblastic leukemia in Austria: report of 20 years' experience. *Wien Klin Wochenschr*. 2002; 114(4):148-57.
34. Stary J, Zimmermann M, Campbell M, Castillo L, Dibar E, Donska S, et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *J Clin Oncol*. 2014;32(3):174-84.
35. Paolucci G, Vecchi V, Favre C et al: Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. Long-term results of the AIEOP-ALL 87 study. *Haematologica* 2001; 86(5):478-84.

36. Pui CH, Evans WE: Acute lymphoblastic leukemia: Drug therapy. *N Engl J Med* 1998; 339(9):605-615.
37. Chessells JM: Central nervous system – directed therapy for acute lymphoblastic leukemia. Pui CH: Treatment of acute leukemias. Humana Press 2003, p:161-172.
38. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK et al: Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Faber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 2001; 97:1211-1218.
39. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):2938-48.
40. McMillin G.A. Pharmacogenetics. In D. E. Bruns, E. R. Ashwood, & C. A. Burtis, eds. *Fundamentals of Molecular Diagnostics*; 2007. pp. 197–215.
41. Wang L, Weinshilboum R. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. *Oncogene.* 2006;25(11):1629-38.
42. Krejsa C, Rogge M, Sadee W. Protein therapeutics: new applications for pharmacogenetics. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(6):507-21.
43. Widmer N, Bardin C, Chatelut E, Paci A, Beijnen J, Levêque D, et al. Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two--targeted therapies. *Eur J Cancer.* 2014;50(12):2020-36.
44. Farber S, Diamond LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med.* 1948;238(23):787-93.
45. Assaraf YG. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(1):153-81.
46. Assaraf YG. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat.* 2006;9(4-5):227-46.
47. Hou Z, Matherly LH. Biology of the major facilitative folate transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Curr Top Membr.* 2014;73:175-204.
48. Allegra CJ, Chabner BA, Drake JC, Lutz R, Rodbard D, Jolivet J. Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates. *J Biol Chem.* 1985;260(17):9720-6.

49. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J*. 2015;14:6.
50. Mahfouz RA, Cortas NK, Charafeddine KM, Abdul Khalik RN, Saredidine DS, Kadi RH, et al. Correlation of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms with homocysteine metabolism in healthy Lebanese adults. *Gene*. 2012;504(2):175-80.
51. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(26):14853-8.
52. Böttiger AK, Hurtig-Wennlöf A, Sjöström M, Yngve A, Nilsson TK. Association of total plasma homocysteine with methylenetetrahydrofolate reductase genotypes 677C>T, 1298A>C, and 1793G>A and the corresponding haplotypes in Swedish children and adolescents. *Int J Mol Med*. 2007;19(4):659-65.
53. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995;10(1):111-3.
54. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998;64(3):169-72.
55. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet*. 2015;58(1):1-10.
56. Yan J, Yin M, Dreyer ZE, Scheurer ME, Kamdar K, Wei Q, et al. A meta-analysis of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;58(4):513-8.
57. Koppen IJ, Hermans FJ, Kaspers GJ. Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010;148(1):3-14.
58. Aplenc R, Thompson J, Han P, La M, Zhao H, Lange B, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2005;65(6):2482-7.

59. Sepe DM, McWilliams T, Chen J, Kershenbaum A, Zhao H, La M, et al. Germline genetic variation and treatment response on CCG-1891. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;58(5):695-700.
60. Milek M, Karas Kuzelicki N, Smid A, Mlinaric-Rascan I. S-adenosylmethionine regulates thiopurine methyltransferase activity and decreases 6-mercaptopurine cytotoxicity in MOLT lymphoblasts. *Biochem Pharmacol*. 2009;77(12):1845-53.
61. Milek M, Smid A, Tamm R, Kuzelicki NK, Metspalu A, Mlinaric-Rascan I. Post-translational stabilization of thiopurine S-methyltransferase by S-adenosyl-L-methionine reveals regulation of TPMT*1 and *3C allozymes. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(7):969-76.
62. Karas-Kuzelicki N, Jazbec J, Milek M, Mlinaric-Rascan I. Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia*. 2009;23(5):971-4.
63. Chen MJ, Shimada T, Moulton AD, Harrison M, Nienhuis AW. Intronless human dihydrofolate reductase genes are derived from processed RNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(23):7435-9.
64. Askari BS, Krajcinovic M. Dihydrofolate reductase gene variations in susceptibility to disease and treatment outcomes. *Curr Genomics*. 2010;11(8):578-83.
65. Xu X, Gammon MD, Wetmur JG, Rao M, Gaudet MM, Teitelbaum SL, et al. A functional 19-base pair deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (DHFR) and risk of breast cancer in multivitamin users. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(4):1098-102.
66. Gellekink H, Blom HJ, van der Linden IJ, den Heijer M. Molecular genetic analysis of the human dihydrofolate reductase gene: relation with plasma total homocysteine, serum and red blood cell folate levels. *Eur J Hum Genet*. 2007;15(1):103-9.
67. Dulucq S, St-Onge G, Gagné V, Ansari M, Sinnott D, Labuda D, et al. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood*. 2008;111(7):3692-700.
68. Parle-McDermott A, Pangilinan F, Mills JL, Kirke PN, Gibney ER, Troendle J, et al. The 19-bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR) may

- decrease rather than increase risk for spina bifida in the Irish population. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(11):1174-80.
69. Mishra PJ, Humeniuk R, Longo-Sorbello GS, Banerjee D, Bertino JR. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(33):13513-8.
70. Milic V, Jekic B, Lukovic L, Bunjevacki V, Milasin J, Novakovic I, et al. Association of dihydrofolate reductase (DHFR) -317AA genotype with poor response to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(2):178-83.
71. Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Saavedra-Herrera MV, Rivera-Ramírez AB, Terán-Porcayo MA, Del Carmen Alarcón-Romero L, et al. Survival and risk of relapse of acute lymphoblastic leukemia in a Mexican population is affected by dihydrofolate reductase gene polymorphisms. *Exp Ther Med*. 2012;3(4):665-72.
72. Ongaro A, De Mattei M, Della Porta MG, Rigolin G, Ambrosio C, Di Raimondo F, et al. Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. *Haematologica*. 2009;94(10):1391-8.
73. Matherly LH, Hou Z, Deng Y. Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(1):111-28.
74. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, et al. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab*. 2000;70(4):310-5.
75. Laverdière C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100(10):3832-4.
76. Wang L, Chen W, Wang J, Tan Y, Zhou Y, Ding W, et al. Reduced folate carrier gene G80A polymorphism is associated with an increased risk of gastroesophageal cancers in a Chinese population. *Eur J Cancer*. 2006;42(18):3206-11.
77. Galbiatti AL, Ruiz MT, Rezende Pinto D, Raposo LS, Maníglia JV, Pavarino-Bertelli EC, et al. A80G polymorphism of reduced folate carrier 1 (RFC1) gene and head and

- neck squamous cell carcinoma etiology in Brazilian population. *Mol Biol Rep.* 2011;38(2):1071-8.
78. de Jonge R, Tissing WJ, Hooijberg JH, Jansen G, Kaspers GJ, Lindemans J, et al. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2009;113(10):2284-9.
79. Silva RM, Fontes AC, Silva KA, Sant'Ana TA, Ramos FJ, Marques-Salles TeJ, et al. Polymorphisms involved in folate metabolism pathways and the risk of the development of childhood acute leukemia. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013;17(2):147-52.
80. Leyva-Vázquez MA, Organista-Nava J, Gómez-Gómez Y, Contreras-Quiroz A, Flores-Alfaro E, Illades-Aguiar B. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to survival and risk of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *J Investig Med.* 2012;60(7):1064-7.
81. He HR, Liu P, He GH, Dong WH, Wang MY, Dong YL, et al. Association between reduced folate carrier G80A polymorphism and methotrexate toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(12):2793-800.
82. Lurje G, Manegold PC, Ning Y, Pohl A, Zhang W, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic markers. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(5):1000-7.
83. Lima A, Azevedo R, Sousa H, Seabra V, Medeiros R. Current approaches for TYMS polymorphisms and their importance in molecular epidemiology and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics.* 2013;14(11):1337-51.
84. Lynch M, Scofield DG, Hong X. The evolution of transcription-initiation sites. *Mol Biol Evol.* 2005;22(4):1137-46.
85. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res.* 2001;7(12):4096-101.

86. Pullmann R, Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, Ladner RD, Gorospe M. Differential stability of thymidylate synthase 3'-untranslated region polymorphic variants regulated by AUF1. *J Biol Chem*. 2006;281(33):23456-63.
87. Lima A, Seabra V, Bernardes M, Azevedo R, Sousa H, Medeiros R. Role of key TYMS polymorphisms on methotrexate therapeutic outcome in portuguese rheumatoid arthritis patients. *PLoS One*. 2014;9(10):e108165.
88. Krajcinovic M, Costea I, Primeau M, Dulucq S, Moghrabi A. Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(6):374-80.
89. Radojkovic D, Kusic J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clin Chem*. 2000;46(6 Pt 1):883-4.
90. Dotor E, Cuatrecasas M, Martínez-Iniesta M, Navarro M, Vilardell F, Guinó E, et al. Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2006;24(10):1603-11.
91. Herrlinger KR, Cummings JR, Barnardo MC, Schwab M, Ahmad T, Jewell DP. The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(10):705-11.
92. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(2):83-103.
93. Martin A, Morgan E, Hijiya N. Relapsed or refractory pediatric acute lymphoblastic leukemia: current and emerging treatments. *Paediatr Drugs*. 2012;14(6):377-87.
94. Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(2):117-29.
95. Ribera JM, Oriol A. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(5):1033-42.
96. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-43.
97. Miller DR, Leikin S, Albo V, Sather H, Hammond D. Prognostic importance of morphology (FAB classification) in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Br J Haematol*. 1981;48(2):199-206.

98. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):551-65.
99. te Loo DM, Kamps WA, van der Does-van den Berg A, van Wering ER, de Graaf SS. Prognostic significance of blasts in the cerebrospinal fluid without pleiocytosis or a traumatic lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia: experience of the Dutch Childhood Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2006;24(15):2332-6.
100. Lazic J, Tomic N, Dokmanovic L, Krstovski N, Rodic P, Pavlovic S, Janic D. Clinical features of the most common fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Oncol*. 2010;27(2):449-53.
101. Stanulla M, Cario G, Meissner B et al: Integrating molecular information into treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia - A perspective from the BFM Study Group. *Blood Cells Mol Disease* 2007; 39:160–163.
102. Vrooman LM, Silverman LB. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Curr Opin Pediatr*. 2009;21(1):1-8.
103. Karsa M, Dalla Pozza L, Venn NC, Law T, Shi R, Giles JE, Bahar AY, Cross S, Catchpole D, Haber M, Marshall GM, Norris MD, Sutton R. Improving the identification of high risk precursor B acute lymphoblastic leukemia patients with earlier quantification of minimal residual disease. *PLoS One*. 2013;8(10):e76455.
104. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. 2015;373(16):1541-52.
105. Deligezer U, Akisik E, Dalay N. Genotyping of the MTHFR gene polymorphism, C677T in patients with leukemia by melting curve analysis. *Mol Diagn*. 2003;7(3-4):181-5.
106. Yeoh AE, Lu Y, Chan JY, Chan YH, Ariffin H, Kham SK, Quah TC. Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia shows protection in Malay boys: results from the Malaysia-Singapore ALL Study Group. *Leuk Res*. 2010;34(3):276-83.
107. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(22):12810-5.

108. Gemmati D, De Mattei M, Catozzi L, Della Porta M, Serino ML, Ambrosio C, et al. DHFR 19-bp insertion/deletion polymorphism and MTHFR C677T in adult acute lymphoblastic leukaemia: is the risk reduction due to intracellular folate unbalancing? *Am J Hematol.* 2009;84(8):526-9.
109. Djordjevic V, Rakicevic LJ, Mikovic D, Kovac M, Miljic P, Radojkovic D, Savic A. Prevalence of factor V leiden, factor V cambridge, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations in healthy and thrombophilic Serbian populations. *Acta Haematol.* 2004;112(4):227-9.
110. www.1000genomes.org
111. Bolufer P, Collado M, Barragan E, Cervera J, Calasanz MJ, Colomer D, Roman-Gomez J, Sanz MA. The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. *Haematologica.* 2007;92(3):308-14.
112. Zhang L, Taub JW, Williamson M, Wong SC, Hukku B, Pullen J, et al. Reduced folate carrier gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationship to immunophenotype and ploidy. *Clin Cancer Res.* 1998;4(9):2169-77.
113. Wojtuszkiewicz A, Peters GJ, van Woerden NL, Dubbelman B, Escherich G, Schmiegelow K, et al. Methotrexate resistance in relation to treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol.* 2015;8:61.
114. Al-Shakfa F, Dulucq S, Brukner I, Milacic I, Ansari M, Beaulieu P, Moghrabi A, Laverdiere C, Sallan SE, Silverman LB, Neuberg D, Kutok JL, Sinnott D, Krajcinovic M. DNA variants in region for noncoding interfering transcript of dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2009;15(22):6931-8.
115. Treviño LR, Shimasaki N, Yang W, Panetta JC, Cheng C, Pei D, Chan D, Sparreboom A, Giacomini KM, Pui C-H, Evans WE, Relling M V. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J. Clin. Oncol.* 2009. 27: 5972–8.
116. Lopez-Lopez E, Ballesteros J, Piñan M a, Sanchez de Toledo J, Garcia de Andoin N, Garcia-Miguel P, Navajas A, Garcia-Orad A. Polymorphisms in the methotrexate

- transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet. Genomics*. 2013;23:53–61.
117. El-Khodary NM, El-Haggag SM, Eid MA, Ebeid EN. Study of the pharmacokinetic and pharmacogenetic contribution to the toxicity of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Med Oncol*. 2012;29(3):2053-62.
 118. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 2012;30(14):1663-9.
 119. Yang L, Hu X, Xu L. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on methotrexate-induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2012;33(5):1445-54.
 120. Araoz HV, D'Aloi K, Foncuberta ME, Sanchez La Rosa CG, Alonso CN, Chertkoff L, Felice M. Pharmacogenetic studies in children with acute lymphoblastic leukemia in Argentina. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(5):1370-8.
 121. D'Angelo V, Ramaglia M, Iannotta A, Crisci S, Indolfi P, Francese M, et al. Methotrexate toxicity and efficacy during the consolidation phase in paediatric acute lymphoblastic leukaemia and MTHFR polymorphisms as pharmacogenetic determinants. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;68(5):1339-46.
 122. Kantar M, Kosova B, Cetingul N, Gumus S, Toroslu E, Zafer N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene polymorphisms and therapy-related toxicity in children treated for acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(6):912-7.
 123. Er ulj N, Kotnik BF, Debeljak M, Jazbec J, Dolžan V. Influence of folate pathway polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicity and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(6):1096-104.
 124. Schmiegelow K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *Br J Haematol*. 2009;146(5):489-503.
 125. Rocha JC, Cheng C, Liu W, Kishi S, Das S, Cook EH, et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005;105(12):4752-8.

126. Santucci R, Levêque D, Lescoute A, Kemmel V, Herbrecht R. Delayed elimination of methotrexate associated with co-administration of proton pump inhibitors. *Anticancer Res.* 2010;30:3807.
127. Nacional Cancer Institute, Cancer therapy evaluation program: Common toxicity criteria manual, Version 2.0, 1999;1-29.
128. <http://www.bfm-international.org/trials.php>
129. Muwakkat S, Al-Aridi C, Samra A, Saab R, Mahfouz RA, Farra C, et al. Implementation of an intensive risk-stratified treatment protocol for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia in Lebanon. *Am J Hematol.* 2012;87(7):678-83.
130. Badke C, Fleming A, Iqbal A, Khilji O, Parhas S, Weinstein J, Morgan E, Hijiya N. Rechallenging With Intrathecal Methotrexate After Developing Subacute Neurotoxicity in Children With Hematologic Malignancies. *Pediatr Blood Cancer.* 2016;63(4):723-6.
131. Bhojwani D, Sabin ND, Pei D, Yang JJ, Khan RB, Panetta JC, Krull KR, Inaba H, Rubnitz JE, Metzger ML, Howard SC, Ribeiro RC, Cheng C, Reddick WE, Jeha S, Sandlund JT, Evans WE, Pui CH, Relling MV. Methotrexate-induced neurotoxicity and leukoencephalopathy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2014;32(9):949-59.
132. Mikkelsen TS, Mamoudou AD, Tuckuviene R, Wehner PS, Schroeder H. Extended duration of prehydration does not prevent nephrotoxicity or delayed drug elimination in high-dose methotrexate infusions: a prospectively randomized crossover study. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(2):297-301.
133. Kawabata K, Makino H, Nagake Y, et al. A case of methotrexate-induced acute renal failure successfully treated with plasma perfusion and sequential hemodialysis. *Nephron* 1995;71:233.
134. Caldeira T, Costa V, Silva I, Oliva T, Norton L. Anaphylactoid reaction to high-dose methotrexate and re-administration after a successful desensitization. *Pediatr Hematol Oncol.* 2008;25(2):131-4
135. Hagag AA, AbdElaal AM, Elfaragy MS, Hassan SM, Elzamarany EA. Therapeutic value of black seed oil in methotrexate hepatotoxicity in Egyptian

- children with acute lymphoblastic leukemia. *Infect Disord Drug Targets*. 2015;15(1):64-71.
136. Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J, Garcia-Orad A. A systematic review and meta-analysis of MTHFR polymorphisms in methotrexate toxicity prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(6):498-506.
137. Paugh SW, Stocco G, Evans WE. Pharmacogenomics in pediatric leukemia. *Curr Opin Pediatr*. 2010;22(6):703-10.
138. van Dijkhuizen EH, Pouw JN, Scheuern A, Hügler B, Hardt S, Ganser G, Kummerle-Deschner JB, Horneff G, Holzinger D, Bulatovic Calasan M, Wulffraat NM. Methotrexate intolerance in oral and subcutaneous administration in patients with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional, observational study. *Clin Exp Rheumatol*. 2016;34(1):148-54.
139. Yesudian PD, Leman J, Balasubramaniam P, Macfarlane AW, Al-Niaimi F, Griffiths CE, Burden AD, Warren RB. Effectiveness of Subcutaneous Methotrexate in Chronic Plaque Psoriasis. *J Drugs Dermatol*. 2016;15(3):345-9.
140. Kopylov U, Katsanos KH, van der Woude CJ, Karmiris K, Hernandez V, Odes S, Papamichael K, Koutroubakis IE, Bojic D, Kaimakliotis I, Fiorino G, Papageorgiou N, Pineda JR, Strongili K, Sanroman L, Mantzaris GJ, Jojic N, Paspatis G, Christodoulou DK, Ben-Horin S, Tsianos EV. European experience with methotrexate treatment in Crohn's disease: a multicenter retrospective analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2016 Feb 18. [*Epub ahead of print*]
141. Eleftheriou D, Varnier G, Dolezalova P, McMahon AM, Al-Obaidi M, Brogan PA. Takayasu arteritis in childhood: retrospective experience from a tertiary referral centre in the United Kingdom. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:36.
142. Sene D. Eosinophilic fasciitis (Shulman's disease): diagnostic and therapeutic review. *Rev Med Interne*. 2015;36(11):738-45.
143. Giverhaug T, Loennechen T, Aarbakke J. The interaction of 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX). *Gen. Pharmacol*. 1999;33: 341-6.
144. Volejnikova J, Jarosova M, Pospisilova D, Novak Z, Vrbkova J, Hajduch M, Mihal V. Treatment and prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia on

- protocols ALL-BFM 90, 95 and ALL IC-BFM 2002: a retrospective single-center study from Olomouc, Czech Republic. *Neoplasma*. 2016;63(3):456-61.
145. Hunger SP, Loh ML, Whitlock JA, Winick NJ, Carroll WL, Devidas M, Raetz EA; COG Acute Lymphoblastic Leukemia Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(6):957-63.
 146. Bhojwani D, Pui CH. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):e205-17.
 147. Ceppi F, Cazzaniga G, Colombini A, Biondi A, Conter V. Risk factors for relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: prediction and prevention. *Expert Rev Hematol*. 2015;8(1):57-70.
 148. Teachey DT, Hunger SP. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2013;162(5):606-20.
 149. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2008;322(5906):1377-80.
 150. Kodidela S, Pradhan SC, Dubashi B, Basu D. Influence of dihydrofolate reductase gene polymorphisms rs408626 (-317A>G) and rs442767 (-680C>A) on the outcome of methotrexate-based maintenance therapy in South Indian patients with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015;71(11):1349-58.
 151. Skibola CF, Forrest MS, Coppédé F, Agana L, Hubbard A, Smith MT, Bracci PM, Holly EA. Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2004;104:2155–62.
 152. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there?. *Blood*. 2012;120(6):1165-74.

BIOGRAFIJA AUTORA

Lazi Jelena, rođena je 1974. godine u Beogradu, gde je završila osnovno i srednje obrazovanje i muzičko obrazovanje i diplomirala na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 2002. godine je lekar Univerzitetske dečje klinike. Magistarsku tezu je odbranila 2007, specijalistički ispit iz pedijatrije 2009. i rad iz uže specijalizacije 2012, a od 2013. godine je klinički asistent na Katedri za pedijatriju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Usavršavala se iz oblasti pedijatrijske hematologije, onkologije i genetike malignih bolesti u zemlji i inostranstvu. Predaje po pozivu na brojnim nacionalnim i internacionalnim skupovima od značajnog i prestižnog stručnog udruženja.

Učestvuje u internacionalnim projektima: ALL IC-BFM 2002 i 2009 protocols, FECS-SIOP: Collaboration between nurses and doctors in paediatric oncology, BFM: NHL and rare syndromes, Recurrent Neuroblastoma and Ewing's sarcoma study i u Central European Pediatric Oncology Early Trial Alliance. Član je Editor Board Member u World Journal of Clinical Case Conference.

Saradnik je na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Srbije: III 41004, potprojekat 2: Farmakogenomika u pedijatrijskoj hematologiji – individualizacija terapije kod pedijatrijskih akutnih leukemija.

Objavila je 108 stručno-naučnih radova, koautor je u dva udžbenika za redovne i posle diplomске medicinske studije i autor jedne monografije. Citirana je preko 40 puta. Mentor je sedam studentskih radova. Dobila je zahvalnice Studentskog parlamenta Medicinskog fakulteta, Medicinskog podmlatka i Centra za stručni i naučno-istraživački rad studenata. Osmislila je i sprovela prvu edukaciju medicinskih sestara u pedijatrijskoj hematologiji i onkologiji. Osnivač je i član Nacionalnog udruženja roditelja dece obolele od raka.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Klin. asist. dr Jelena Lazić

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Značaj polimorfizama u genima koji kodiraju enzime uključene u metabolizam metotreksata u dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 14.4.2016.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Klin. asist. dr Jelena Lazić

Naslov rada: Značaj polimorfizama u genima koji kodiraju enzime uključene u metabolizam metotreksata u dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom

Mentor: Doc. dr Nada Krstovski

Potpisana Jelena Lazić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 14.4.2016.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Značaj polimorfizama u genima koji kodiraju enzime uključene u metabolizam metotreksata u dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda



U Beogradu, 14.4.2016.