

## Bax Gene Polymorphism in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Evaluation of Apoptosis with Conventional Dose-Prednisolone Treatment

### Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemilerinde Bax Gen Polimorfizmi ve Konvansiyonel Doz Prednisolon Tedavisi ile Apoptozun Değerlendirilmesi

Elif Güler Kazancı<sup>1</sup>, Ferah Genel<sup>2</sup>, Hüseyin Onay<sup>3</sup>, Ferda Özkinay<sup>3</sup>, Canan Vergin<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Kliniği, Bursa

<sup>2</sup>Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk İmmunoloji Kliniği, İzmir

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir

<sup>4</sup>Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Kliniği, İzmir

Dergiye Ulaşma Tarihi: 03.09.2019 Dergiye Kabul Tarihi: 09.09.2019 Doi: 10.5505/aot.2019.29981

#### ÖZET

**GİRİŞ ve AMAÇ:** Kanser tedavisinde kullanılan ajanların apoptozu artırarak hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmada akut lenfoblastik lösemili (ALL) çocuklarda BAX gen ekspresyonunu etkileyen G-248A nukleotid polimorfizminin ve apoptozun risk sınıflandırılmasında ve tedavi yanıtının değerlendirilmesindeki önemi araştırıldı.

**YÖNTEM ve GEREÇLER:** Çalışmada apoptoz indeksi (0-11) yaş aralığındaki, yeni tanı 25 ALL' li hastanın kemik iliği aspirasyon örneklerinde 0, 3 ve 8.gün Annexin V- FITC kiti kullanılarak yapıldı. Bax gen polimorfizmi 60 ALL 'li hasta ve 96 sağlıklı kontrol grubunun kan örneklerinde DNA izolasyonu FUJİ QuickGene 810 otomatik nükleik asit pürifikasyon sistemi ile çalışıldı.

**BULGULAR:** Hastaların ortalama yaşı 4.9 olup %28' i standart risk, %44'ü orta risk, %28'i yüksek risk grubundaydı. Spontan apoptoz indeksi (Aİ) ile 3.gün Aİ arasında anlamlı bir fark ve pozitif korelasyon saptandı (18.3±13.7, 19.4±12.7 p= 0,007 r= +0.548). Erken steroid yanıtı kötü olan olgularda 8.gün Aİ anlamlı olarak yüksek gözlemlendi (p<0.05). Pre-B ALL olgularında 0.gün, 3.gün ve 8. gün Aİ anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0.05). Hastaların %84'ünde CD 10 pozitifliği saptanmış olup CD10 ekspresyonu yoğun olan olgularda 3.gün Aİ anlamlı olarak yüksek görüldü (p<0.05). BAX gen polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda değişiklik göstermediği tespit edildi.

**TARTIŞMA ve SONUÇ:** Çalışmamızda konvansiyonel doz prednisolonun apoptozu belirgin bir şekilde indüklediği ve erken steroid yanıtı kötü olan olgularda 8.gün Aİ yüksekliğinin blast yüküyle ilişkili olduğu düşünüldü. CD10 ekspresyonu yoğun olgularda apoptoz oranındaki anlamlı artışın Pre B ALL'de prognoz açısından değerli olduğu kanısına varıldı.

BAX gen polimorfizminin ALL'nin patogenezi, klinik seyir ve prognozdaki etkisinin daha fazla olgu sayısı ile değerlendirilmesi ve apoptoz yolağında rol oynayan diğer proteinlerin de araştırılmasının gerekli olduğu düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Akut lenfoblastik lösemi, Prednisolon, Apoptoz indeksi, BAX gen polimorfizmi

#### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** It is known that the agents used in cancer treatment increase apoptosis and cause cell death. In this study, the importance of G-248A nucleotide polymorphism affecting the BAX gene expression and apoptosis in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) was investigated in the risk classification and the evaluation of the treatment response.

**METHODS:** Apoptosis index was performed by Annexin V- FITC kit for bone marrow aspiration samples of 25 newly-diagnosed (0-11) years old ALL patients on 0th, 3rd and 8th day. Bax gene polymorphism was studied on blood samples of 60 ALL patients and 96 healthy control group, and DNA isolation was studied by FUJİ QuickGene 810 automatic nucleic acid purification system.

**RESULTS:** The mean age of the patients was 4.9, and %28 had a standard risk, %44 had a moderate risk, %28 had high risk. A significant difference and a positive correlation were found between the spontaneous apoptosis index (AI) and the 3rd day AI (18.3±13.7, 19.4±12.7 p= 0,007 r= +0.548). The 8th day AI was found to be significantly higher in patients with poor early steroid response (p<0.05). Apoptosis index; was significantly high on 0th, 3rd and 8th day for PreB ALL cases. 84% of the patients were found to have CD 10 positivity and in

cases with intense CD10 expression, AI was significantly higher on the third day ( $p < 0.05$ ). It was determined that the BAX gene polymorphism did not differ in the patient and control groups.

**DISCUSSION AND CONCLUSION:** In the present study, conventional dose prednisolone was thought to induce apoptosis significantly, and the 8th day AI elevation was associated with blast load in patients with poor early steroid response. It was concluded that the significant increase in apoptosis ratio in cases with intense CD10 expression was a valuable marker in terms of prognosis in Pre B ALL. It was considered necessary to evaluate the effect of BAX gene polymorphism on the pathogenesis, clinical course and prognosis of ALL with more cases, and to investigate other proteins that play a role in the apoptosis pathway.

**Keywords:** acute lymphoblastic leukemia, Prednisolone, Apoptosis index, BAX gene polymorphism

## GİRİŞ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), son 40 yılda tedavisinde önemli gelişmeler sağlanmış, çocukluk çağıının en sık görülen maliyn bir hastalığıdır. Halen ALL'li çocukların 2/3'ünden fazlasında tam kür sağlanabilmektedir. 1980'li yıllarda, prognoz kriterleri özellikle sitogenetik bulgular ile birlikte değerlendirilerek riske göre tedavi gündeme gelmiştir. Uzun süreli olaysız sağkalm, 1965'den önce sadece %5 iken, günümüzde %80-85'in üzerine çıkmıştır (1-3). Akut lenfoblastik lösemide cinsiyet, tanı sırasındaki yaş, organomegali ve lenf nodlarının büyüklüğü, santral sinir sistemi tutulumu, mediastende kitle, hemoglobin (Hb), lökosit ve trombosit sayısı, FAB sınıflaması, immünofenotip, immünooglobülin düzeyi, lösemik hücrelerde myeloid antijen ekspresyonu, glukokortikoid reseptör düzeyi, HLA tipi, hastanın nutrisyonel durumu gibi özelliklerin hastalığın seyrini etkileyen önemli prognostik faktörler olduğu bildirilmiştir (4). Son yıllarda, lösemik hücrelerin biyolojik davranışlarının sınıflandırılmasında bazı spesifik kromozomal translokasyonların varlığında (t(1:19), t(9:22), t(4:11)) prognozun kötü olduğu saptanmıştır. Aksine, sitogenetik olarak hiperdiploidinin (tetraploidi hariç) ve flowsitometrik olarak DNA indeksinin 1.16'nın üzerinde saptanmasının, iyi prognoz kriteri olduğu bildirilmiştir (5-7). Son yıllarda kanser tedavisinde kullanılan ajanların apoptozu artırarak hücre ölümüne yol açtığı görülmektedir. Apoptozu bloke eden sinyaller antikanser ilaçlara direncin gelişmesinde önemli bir mekanizmadır. Farklı neoplastik hastalıkları olan hastalardan alınan hücre kültürlerinden yapılan doku kültürü çalışmalarında apoptotik indeksin belirgin prognostik faktör olduğu söylenmektedir (8). Glukokortikoidlerin (GC) indüklediği apoptoz klinik ve biyolojik öneme sahiptir. İn vitro ve

invivo GC sensitivitesi ALL'li çocuklarda major prognostik faktördür (9,10).

Çalışmalarda kemoterapötik ilaçlara artmış direnç ve apoptozu uğrama kapasitesinde azalma arasında bir ilişkiyi gösterilmiştir (11-13). Sonuç olarak; apoptozu yatkınlık antineoplastik tedaviye yanıtı değerlendirmede önemli bir faktördür. Bu yanıtın ortasında BCL-2, BAX, p53 gibi apoptozu sağlayan proteinler ve son zamanlarda tanımlanan BCL-XL gen ürünü vardır. BAX geninin 5'-UTR de tek bir nukleotid polimorfizmi olan G-248A, BAX ekspresyonunu etkileyerek birçok kanser türünde progresyona neden olur. BAX' taki mutasyonlarla apoptoz geriler ve tümör büyüme faktörlerinde artış olur (14,15).

Bu çalışmada akut lösemilerde BAX gen polimorfizmi ve indüksiyonun ilk haftasında uygulanan konvansiyonel doz prednizolon tedavisi sonrası apoptoz değerlendirildi.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Apoptoz indeksi 0-11 yaş aralığındaki 25 ALL' li hastanın 0, 3. ve 8. gün kemik iliği aspirasyonu (KİA) örneklerinde çalışıldı. BAX gen polimorfizmi ise apoptoz çalışma grubundan 22 hasta ile poliklinik izlemindeki 38 hasta dahil edilerek toplam 60 hasta da değerlendirildi. Sağlıklı 96 birey ise kontrol grubu olarak dahil edildi.

Çalışma İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik kurulu (Sayı: 04) tarafından onaylandı. Tüm yaş gruplarını içerecek şekilde hastaların ailelerinden yazılı ve sözel onam alındı.

Akım sitometri ile apoptozun değerlendirilmesi; KİA örneklerinde 0.gün ve prednisolon tedavisinin 3. ve 8.günü "Annexin V- FITC Apoptoz Tespit Kiti" kullanılarak yapıldı. KİA örneğinden histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılarak mononükleer hücreler izole edildi. Hücreler

fosfat tamponlu solüsyon eklenerek yıkandı. Son yıkamadan sonra hücelere binding buffer ilave edilerek hücre süspansiyonu hazırlandı. Annexin V-FITC apoptosis detection kiti (PN IM3546 Becman Coulter, Fransa) ve hazırlama prosedürü uygulanarak 100 µL hücre süspansiyonuna 1 µL annexin V-FITC solüsyonu ve 5 µL propidium iodide eklendi. Akım sitometri cihazında (Epics XL-MCL, Coulter) okuması yapıldı ve analizi için EXPO 32 ADC software kullanıldı.

Annexin V pozitif ve propidyum iyodür negatif olan hücreler apoptotik hücre olarak alındı. Apoptoz indeksi (Aİ) aşağıdaki gibi hesaplandı:

$$Aİ(\%) = \frac{\text{Apoptotik hücre sayısı}}{\text{incelenen toplam hücre sayısı}} \times 100$$

BAX gen polimorfizminin değerlendirilmesi; periferik kan örneklerinde DNA İzolasyonu

FUJİ QuickGene 810 otomatik nükleik asit pürifikasyon sistemi ile "DNA Whole Blood Kit" kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon için 200 µl kan kullanılarak 30-40 ng/µl konsantrasyonunda DNA elde edildi. BAX geninde polimorfizmleri içeren bölgeler primerler yardımıyla çoğaltıldı. PCR ürünleri amplifikasyonun kontrolü %3'lik agaroz jelde yapıldı. G-248A polimorfizmini içeren PCR ürünleri WAVE Denatüran Yüksek Performanslı Likit Kromatografisi (DHPLC) sistemine yüklenerek analiz edildi.

Hastaların hepsi BFM-TR ALL 2000 protokolüne göre tedavi edildiğinden sınıflamaları, klinik, biyolojik özellikleri ve tedaviye yanıtları bu protokole göre değerlendirildi (Tablo 1).

Kriterler	Standart Risk Grubu (SRG)	Orta Risk Grubu (MRG)	Yüksek Risk Grubu (HRG)
Lökosit sayısı	<20000 / mm <sup>3</sup>	≥20000 / mm <sup>3</sup>	≥20000 / mm <sup>3</sup>
Yaş	≥ 1 ve <6	<1 veya ≥ 6	<1 veya ≥ 10
8.gün PY blast sayısı	<1000/mm <sup>3</sup>	<1000/mm <sup>3</sup>	≥ 1000/mm <sup>3</sup>
T immunolojisi	-	-	+
t(4;11) ve/veya t(9;22)	-	-	+
33. gün kemik iliği yanıtı	M1=Blast <%5	M1=Blast <%5	M2=Blast % 5-20 M3= Blast>21

**Tablo 1.**BFM- TR ALL 2000 protokolüne göre risk grubu kriterleri.

Apoptoz indeksi değerlendirilen tüm hastalarda steroid tedavisi standart dozda başlandı. Tedavinin 8.günü ≥ 1000 blast /mm<sup>3</sup> hastaların prednisolona cevabı kötü olarak kabul edildi (16).

### İSTATİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz için SPPSS 15 programı kullanıldı. Verilerin frekans ve yüzde dağılımları, ortalamaları ve normal dağılım göstermeyen veriler için ortanca değerleri verildi. Gruplardaki verilerin normal dağılım göstermesi durumunda parametrik yöntemler, normal dağılım göstermediği durumlarda ise grup karşılaştırmaları için nonparametrik yöntemler kullanılarak (Mann-Whitney ve Kruskal-Wallis Test) analizler yapıldı. Gruplar arası oranların karşılaştırılmasında Ki kare ve Fischer Testi kullanıldı. P <0.05 istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

### SONUÇLAR

Apoptoz indeksi çalışılan hastaların % 60'ı kız (n=15) % 40'ı erkek (n=10) ve ortalama yaşı 4.9±2.9 yıl, yaş aralığı 20 gün-11 yaş olarak bulundu. Akut lösemili olguların demografik özellikleri Tablo 2 de sunuldu. Yirmi günlük ve 3 aylık T-ALL'li olgular indüksiyon tedavisinin 24. ve 45. günü sepsis ve multiorgan yetmezliği ile kaybedildi.

Apoptoz indeksi değerlendirildiğinde; 0. gün ortalama Aİ ile 3.gün Aİ arasında anlamlı bir fark ve orta derecede pozitif korelasyon gözlemlendi ( 18.3±13.7, 19.4±12.7 p= 0.007 r= +0.548). Sıfırıncı ve 8.gün ortalama Aİ ile 3. ve 8.gün ortalama Aİ arasında anlamlı bir fark ve korelasyon saptanmadı ( 18.3±13.7 ve 16.4±7.8 p=0.510 r= 0.145, 19.4±12.7 ve 16.4±7.8 p=0.352 r=0.194). 8.gün steroid yanıtı kötü olan olgularda 8.gün Aİ anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0.02). Lökosit sayısı

(  $\geq 20000$  ile  $< 20000$ ) ile 0, 3. ve 8.gün Aİ arasında anlamlı bir fark saptanmadı (  $p=0.4$ ,  $p=0.1$ ,  $p=0.2$ ) (Tablo 3).

Pre-B ALL olgularında diğer immünofenotiplere göre 0, 3. ve 8. gün Aİ anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0.04$ ,  $p=0.002$ ,  $p=0.03$ ). Akım sitometri ile blastik hücrelerde CD10 ekspresyonu yüksek olan ( $\geq \%20$ ) olgularda düşük olanlara ( $< \%20$ ) göre 3.gün Aİ anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p=0.004$ ) (Tablo 3). Standart risk grubundaki olgularda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmamakla birlikte spontan apoptozun daha yüksek olduğu görüldü. Tüm risk grupları ile Aİ arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 3). Apoptoz indeksinin remisyona girme zamanı, cinsiyet-yaş, tanıdaki lökosit sayısı, blastik hücre morfolojisi ile değişmediği belirlendi. Apoptoz indeksi ve uzun dönem (10 yıllık) sağkalım oranları analiz edildiğinde 0.gün, 3. ve 8.gün Aİ arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Relaps görülen olgularda ( $n=6$ ) uzun dönem sağkalım %16.6, relaps gözlenmeyen olgularda ( $n=19$ ) oran %94.7 olarak saptanmıştır. Uzun dönem sağkalım oranı %76 olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

ALL'li toplam 60 hasta ile 96 kontrol grubu BAX gen polimorfizmleri yönünden değerlendirildiğinde; hastaların 34'ünde (%56.7) GG, 23'ünde (%38.3) GA, 3'ünde (%5) AA genotipi, sağlıklı kontrol grubunun ise 63'ünde (%65.6) GG, 31'inde (%32.3) GA ve 2'sinde (%2.1) AA genotipi saptandı. ALL ve kontrol grubu arasında genotipik ( GG, GA, AA) ve allelik (G,A) sıklık açısından anlamlı bir fark belirlenmedi ( $p=0.39$ ). ALL'li olgularda immünofenotip ve risk grupları ile genotipik ve allelik sıklık yönünden anlamlı bir fark saptanmadı. Olguların 0., 3. ve 8. gün Aİ ile BAX gen polimorfizmleri arasında da anlamlı fark görülmedi (Tablo 4).

## TARTIŞMA

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), kemik iliğinin anormal hücreler ile dolması ve bu hücrelerin kana ve tüm dokulara yayılması sonucu belirti veren malign bir hastalıktır. Çocukluk çağı lösemileri içinde ALL % 80 oranıyla en sık görülen lösemi şeklidir (17,18).

**Tablo 2.** Akut lösemili olguların demografik özellikleri

ÖZELLİK	SAYI	%
<b>Cinsiyet / Yaş</b> (ortalama X±SD) Erkek / (5.8±2.6) Kız / (4.4±3.1)	10 15	40 60
<b>Lökosit sayısı</b> <20000/mm <sup>3</sup> ≥20000/mm <sup>3</sup>	17 8	68 32
<b>FAB sınıflama</b> L1 L2	22 3	88 12
<b>8.gün tedavi yanıtı</b> iyi kötü	19 6	76 24
<b>Risk grubu</b> SRG MRG HRG	7 11 7	28 44 28
<b>İmmünofenotip</b> PreB Pre B dışı	20 5	80 20
<b>33.gün K.İ. yanıtı</b> M1 M2 M3	23 1 0	92 8 0
<b>Relaps / Sağ kalım</b> Relaps (+) Relaps (-)	6/1 19/18	24/16.6 76/94.7
<b>Sağ Kalım</b> (10 yıllık)	19	76

Glukokortikoidler tüm ALL tedavi protokollerinde önemli bir role sahiptir. Çalışmalar düşük doz prednizolonun lenfoid hücre hatları üzerinde proliferatif etkiye, yüksek dozlarında apoptotik etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Apoptozun indüklenmesi, anti-kanser terapisi için anahtar bir mekanizmadır. Glukokortikoid kaynaklı apoptoza direnç, kötü prognoz ile ilişkilidir (19,20).

Malinowska ve arkadaşlarının akut lösemili 38 çocukta spontan ve indüksiyon tedavisi sonrası blastlardaki apoptoz indeksi ve intrasellüler PH'in prognostik önemi çalışmasında tedavi yanıtı ile Aİ arasında korelasyon bulunmamıştır. Bununla birlikte spontan apoptozu ortanca değer altında olan hastalarda tüm istenmeyen olaylar ( tedaviye direnç, relaps ve ölüm) izlenmiştir. Ayrıca

intrinsik hücrel duyarlılığın bir ölçüsü olan spontan apoptozun sitotoksik ajanların neden olduğu apoptozdan farklı olduğu sonucuna varılmıştır (21).

Yıldırım ve arkadaşlarının ALL'li çocuklarda yüksek doz metilprednisolon (YDMP) ile indüklenmiş myeloid seri hücre proliferasyonu bu bulgular kısa kür YDMP tedavisinin lenfoblast apoptozu ve myeloid proliferasyonu arttırdığını göstermiştir (22).

ve lenfoblast apoptozu çalışmasında blastik hücrelerin ortalama apoptoz yüzdeleri 0 ve 7. günle karşılaştırıldığında 3. gün anlamlı olarak yüksek belirlenmiştir. Myeloid seri hücrelerinin K.İ.'deki ortalama yüzdesi 7. günde anlamlı olarak yüksek saptanmış olup

**Tablo 3:** Lökosit sayısı, 8. gün prednisolon yanıtı, immunfenotip, antijen ekspresyonu ve risk grupları ile 0., 3. ve 8.gün apoptoz indeksleri

	<b>0.gün % Ai</b>	<b>APOPTOZ İNDEKS</b>	
		<b>3.gün % Ai</b>	<b>8.gün %Ai</b>
<b>Lenfoblast (KİA)</b>			
Ortalama	18.3±13.7	19.4±12.7	16.4±7.8
Ortanca	15.3	16.1	14.3
Minimum-maksimum	2.9-64.7	3.1-50.5	7-34.8
<b>Lökosit sayısı (mm<sup>3</sup>)</b>			
≥20000 (n=8)	14.1	11.2	11.7
<20000 (n=17)	16.1	17.7	15.4
P	0.4	0.1	0.2
<b>8. gün prednisolon yanıtı</b>			
İyi yanıt (n=19)	14.7	16.1	13.3
Kötü yanıt (n=6)	16.1	17.3	28.1
P	0.7	0.8	0.02
<b>İmmunfenotip</b>			
Pre B (n=20)	16.1	19.9	15.7
Pre B dışı (n=5)	9.2	6.9	10.5
P	0.04	0.002	0.03
<b>Antijen ekspresyonu</b>			
CD10 ≥%20 (n=21)	16.1	17.7	15.6
CD10 <%20 (n=4)	7.9	5.0	10.7
P	0.1	0.004	0.138
<b>Risk grupları</b>			
SRG (n=7)	26.1	16.7	15.4
MRG (n=11)	12.7	13.6	13.1
HRG (n=7)	16.2	12.4	27.4
P	0.4	0.5	0.1



**Tablo 4:** Kontrol ve ALL grubunda BAX geni G(-248)A polimorfizminin genotipik sıklığı, immunfenotip, risk grupları ve apoptoz indeksleri

	Genotipik sıklık %			p
	GG	GA	AA	
<b>Grup</b>				
Kontrol (n=96)	65.6 (n=63)	32.3 (n=31)	2.1 (n=2)	>0.05
ALL (n=60)	56.7 (n=34)	38.3 (n=23)	5 (n=3)	>0.05
<b>İmmunfenotip</b>				
Pre B (n=46)	52 (n=24)	43 (n=20)	5 (n=2)	>0.05
Diğer (n=14)	80 (n=11)	33 (n=2)	17 (n=1)	>0.05
<b>Risk Grupları</b>				
SRG (n=23)	43.5 (n=10)	56.5 (n=13)	0 (n=0)	>0.05
MRG (n=27)	66.7 (n=18)	22.2 (n=6)	11.1 (n=3)	>0.05
HRG (n=10)	60 (n=6)	40 (n=4)	0 (n=0)	>0.05
<b>Aİ % (Ortanca)</b>				
0.gün (n=22)	14.3 (n=15)	18.9 (n=7)	0 (n=0)	>0.05
3.gün (n=22)	15.7 (n=15)	16.6 (n=7)	0 (n=0)	>0.05
8.gün (n=22)	15.4 (n=15)	15.9 (n=7)	0 (n=0)	>0.05

2006' da Erduran ve arkadaşlarının ALL'li çocuklarda YDMP ve konvansiyel dozda prednisolon tedavisinin karşılaştırıldığı çalışmada; iki grup arasında 3.gün lenfoblastlardaki apoptoz yüzdesi 0. ve 7. günden anlamlı olarak yüksek saptanmış olup en yüksek apoptoz YDMP kullanılan grupta 3. gün gözlenmiştir. Bu çalışmada lenfoblast apoptozunda YDMP' nun konvansiyonel dozdaki prednisolona göre daha efektif olduğu sonucuna varılmıştır.

Bizim çalışmamızda da prednisolon tedavisinin 3.gününde apoptoz indeksinde anlamlı bir artış saptanmış olup spontan apoptoz ile 3.gün Aİ arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Bu

sonuç literatürle uyumludur (23). Erken steroid yanıtı kötü olan olgularda 8.gün Aİ yüksekliğinin blast yüküyle ilişkili olduğu düşünülmüştür.

Singh ve arkadaşlarının çalışmasında pediatrik lösemili vakalarda prognostik belirleyici olarak apoptozun önemine işaret eden ilginç noktalar ileri sürülmüştür. Düşük spontan Aİ ile yüksek lökosit sayısı, T-ALL ve yüksek risk grubu arasında anlamlı ilişki belirlenmiştir (24).

Yayınlarda Pre B ALL'de prognoz daha iyi olmasının bu grupta tanıda beyaz küre sayısının düşüklüğü, 50'nin üzerinde hiperdiploidi gözlenmesi ve CD 10 ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir

(25,26). Literatürde Pediatrik Onkoloji Grubu tarafından 1300'e yakın ALL olgusuna ait verilerle yapılan araştırmalarda CD45 ve CD20 pozitifliğinin kantitatif tayininin özellikle prognoz ile ilgili yönlendirici bilgi sağladığı bildirilmektedir. Bu araştırmaya göre CD45 pozitifliğinin düşük yoğunlukta olması iyi prognoz göstergesi iken, CD20 kantitatif tayininde yüksek değerler elde edilmesinin kötü prognoz belirtisi olduğu bildirilmektedir (27).

Çalışmamızda %84 vakada CD 10 pozitifliği saptanmış olup CD 10 ekspresyonu yoğun olan olgularda Aİ yüksekliğinin Pre B ALL'de iyi prognoz göstergesi sayılabileceği düşünülmüştür.

Apoptoza yatkınlık, antineoplastik tedaviye yanıtı değerlendirmede önemli bir faktördür. BCL-2 ailesi üyeleri apoptozun santral regülatörü olarak düşünülür. BCL-2 ve BAX apoptozun dengelenmesinde en önemli proteinlerdir. Bu proteinler anti-apoptotik ve proapoptotik özelliklere sahiptir. Lenfoid lösemide bu denge bozulmuştur. BCL-2/BAX oranının yüksekliği kötü prognozu gösterir (28). Çalışmalarda yüksek BAX seviyesi AML'de iyi prognoz ile bağlantılı iken BCL-2'nin artmış ekspresyonu kronik lösemi ve lenfomalarda kötü prognostik faktör olarak değerlendirilmiştir (29).

Ghasemi ve arkadaşlarının çalışmasında Gc dirençli olan CCRF-CEM hücrelerinde farklı zamanlarda yüksek doz prednisolonun (YDP) BAX gen ekspresyonunda artışa, diğer yandan BCL-2 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Özellikle relaps pediatrik ALL'de YDP'nun BCL-2 ve BAX gen ekspresyonunu değiştirerek apoptoza yatkınlığı arttırdığı sonucuna varılmıştır (30).

Moazami ve arkadaşlarının ALL'de BCL-2 ve BAX gen promotör bölge polimorfizminin prognostik skorlamadaki güvenilirliğinin araştırıldığı çalışmalarında BAX G-248A'da ALL ve sağlıklı kontrol grubunda farklılık

saptanmazken, BCL-2 C-938A polimorfizminde anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Aynı zamanda sağ kalım oranı ve süresinde de anlamlı bir fark gözlenmiş olup BCL-2 promotör bölgesi polimorfizminin puanlama sistemi içinde BAX gen promotör polimorfizmine göre daha güvenilir olduğu gösterilmiştir (31).

Pediatrik lösemilerde apoptozun prognostik önemi ile ilgili Singh ve arkadaşlarının çalışmasında düşük spontan Aİ ile yüksek risk grubu arasında ilişki olmasına karşın 0. gün ve 35.gün Aİ ile Bax/Bcl-2 oranında farklılık bulunmamıştır (24). Çalışmamızda apoptozun G-248A polimorfizmi ile değişmediği, tanıda lökosit ve blast sayısı ile G ve A allel sıklığı açısından anlamlı fark olmadığı görülmüştür (Tablo 4).

Sonuç olarak çalışmamızda konvansiyonel doz prednisolonun apoptozu belirgin bir şekilde indüklediği, Pre B ALL'de ve CD10 ekspresyonu yoğun olgularda apoptoz indeksindeki artışın prognoz açısından değerli olduğu düşünülmüştür. Lökosit sayısı ile Aİ arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmasa da tanıdaki yüksek lökosit sayısının spontan Aİ'nin düşük oluşu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu gözlem daha çok hasta sayısı ile desteklenmelidir.

G-248A polimorfizminin çocukluk çağı ALL'nin patogenezinde, klinik seyir ve prognozunda belirgin rol oynamadığı, BCL-2 ailesi üyelerinin çok faktörlü bir yaklaşımla değerlendirilmesi gerektiği, bu verilerin daha büyük örneklerden oluşan ileri çalışmalar ile tekrarlanması ve apoptoz yolağında rol oynayan diğer proteinlerin de araştırılmasının gerekli olduğu düşünülmüştür.

#### **FİNANSAL DESTEK**

Bu çalışmadaki finansal destek İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik kurulunun (Sayı: 04) onayı ile Novonordisk firmasının katkısı ile gerçekleştirilmiştir.

#### **REFERANSLAR**

1. Gatta G, Capocaccia R, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Terenziani M, et al. Childhood cancer survival trends in Europe: A EURO CARE Working Group study. J Clin Oncol 2005 23: 3742-51.
2. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA Cancer J Clin 2011; 61 : 212-36.
3. Aref S, Salama O, Al-Tonbary Y, Mansour A. Assessment of Bcl-2 expression as modulator of fas mediated apoptosis in acute leukemia. Hematology 2004; 9 : 113-21.
4. Smith M, Arthur D, Camitta B et al. Uniform approach to risk classification and treatment

- assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996;14:18-24.
5. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: A combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 2007; 109 : 926-35.
  6. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Moskowitz N, Raetz EA. Childhood acute lymphoblastic leukemia in the age of genomics. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46 : 570-8. 6
  7. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: An update. *J Clin Oncol* 2011; 29 : 551-65.
  8. Martinez-Lorenz0 MJ, Gamen S, Etxeberria J et al. Resistance to apoptosis correlates with a highly proliferative phenotype and loss of FAS and CPP32 (Caspase-3) expression in human leukemia cells: *Int J Cancer*, 1998;75:473-81.
  9. Banker DE, Groudine M, Norwood T, Appelbaum FR. Measurement of spontaneous and therapeutic agent-induced apoptosis with BCL-2 protein expression in acute myeloid leukemia. *Blood* 1997; 89 : 243-55.
  10. Erduran E, Tekelioğlu Y, Karakaş T, Gedik Y and Mert MF. Comparison of the apoptotic effects on lymphoblasts and on increase of myeloid lineage cells of a short-time, high dose methylprednisolone and the conventional-dose prednisolone treatments in children with acute lymphoblastic leukemia June 5, 2006
  11. Bhushan B, Ahuja D, Verma S, Saluja S, Siddiqui S, Kapur S, et al. Relation of cell viability and apoptosis with clinical remission following induction chemotherapy in ALL and AML. *J Exp Clin Cancer Res* 2007; 26 : 313-21. 6
  12. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 1993; 74:957,
  13. Keane R W, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea J R, Krajewski S, Reed J C, Dietrich W D. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 422-429.
  14. C. Yin, C.M. Knudson, S.J. Korsmeyer, T. Van Dyke, Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo, *Nature* 385 (1997) 637–640.
  15. Hogarth LA, Hall AG. Increased BAX expression is associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93 : 2671-8.
  16. Yüksel-Soycan L for the Turkish BFM Group. BFM-TR ALL 2000: First Turkish multicentric study in the treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia *Pediatric Blood & Cancer* 2006; 47:426-427.
  17. Hossain T, Mannan M, Nahar S, et al (2016). Effectiveness of dexamethasone compared with Prednisolone in induction therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Paediatr Surg Bangladesh*, 6, 3-9.
  18. Aghvami M, Ebrahimi F, Zarei MH, et al (2018). Matrine induction of ROS mediated apoptosis in human aLL B-lymphocytes via mitochondrial targeting. *Asian Pac J Cancer Prev*, 19, 555-60.
  19. Hulleman E, Kazemier KM, Holleman A, et al (2009). Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*, 113, 2014-21.
  20. Zhang S-F, Wang X-L, Yang X-Q, et al (2014). Autophagy-associated targeting pathways of natural products during cancer treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15, 10557-63
  21. Malinowska I, Stelmaszczyk A, Wasik M, Milewska RR: Apoptosis and pH of blasts in acute childhood leukemia. *Med Sci Monit*.2002;8(6):441-447.
  22. Yıldırım A, Erduran E, Tekelioğlu Y, Dilber E, Gedik Y. Proliferation of myeloid lineage cells and apoptosis of lymphoblastic leukemic cells induced by short -course high-dose methylprednisolone in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Turkish Journal of Pediatrics* 2002;44:116-121.
  23. Erduran E, Tekelioğlu Y, Karakaş T, Gedik Y and Mert MF. Comparison of the apoptotic effects on lymphoblasts and on increase of myeloid lineage cells of a short-time, high dose methylprednisolone and the conventional-dose prednisolone treatments in children with acute lymphoblastic leukemia June 5, 2006
  24. Singh A, Bhatia P, Trehan A, Bansal D, Singh A, Bhatia A. Low spontaneous apoptosis index at diagnosis predicts a high-risk phenotype in paediatric acute lymphoblastic leukemia. *Indian J Med Res*. 2018;147:248–55
  25. Pui CH, Rivera GK, Hancock ML et al. Clinical significance of CD10 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1993;7:35-40.
  26. Borowitz MJ, Shuster JJ, Civin CL et al. Prognostic significance of CD34 expression in childhood B precursor acute lymphocytic leukemia: A Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1990;8:1389-1398.
  27. Borowitz MJ, Shuster J, Carroll AJ, Nash M, Look AT, Camitta B, Mahoney D, Lauer SJ, Pullen DJ. Prognostic significance of fluorescence intensity of surface marker expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1997;89(11):3960-6.
  28. Azimi A, Majidinia M, Shafiei-Irannejad V, et al . Suppression of p53R2 gene expression with specific siRNA sensitizes HepG2 cells to doxorubicin. *Gene*. 2018; 642, 249-55.
  29. Ong YL, McMullin MF, Bailie KE, Lappin TR, Jones FG, Irvine AE, et al. High bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2000;111:182–9.
  30. Ghasemi A, Khanzadeh T, Heydarabad MZ et al. Evaluation of BAX and BCL-2 Gene Expression and Apoptosis Induction in Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line CCRFCM after High- Dose Prednisolone Treatment . *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018;19 (8), 2319-2323
  31. Moazami-Goudarzi M, Farshdousti-Hagh M, Hoseinpour-Feizi A, et al. The acute lymphoblastic leukemia prognostic scoring whether it is Possible by BCL-2, BAX gene promoter genotyping *Caspian J Intern Med* 2016; 7(2): 105-113.