

ЗНАЧАЈ ОДРЕЂИВАЊА ГЕНОТИПА ТИОПУРИН-S-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЕ КОД ДЕЦЕ С АКУТНОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕУКЕМИЈОМ ТОКОМ ТЕРАПИЈЕ ОДРЖАВАЊА

Лидија ДОКМАНОВИЋ¹, Драгана ЈАНИЋ¹, Нада КРСТОВСКИ¹,
Бранка ЗУКИЋ², Наташа ТОШИЋ², Соња ПАВЛОВИЋ²

¹Универзитетска дечја клиника, Београд;

²Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Тиопурин-S-метилтрансфераза (*TPMT*) је ензим који катализује инактивацију меркаптопурина, лека који се широко примењује у лечењу акутне лимфобластне леукемије (АЛЛ) код деце. Када се особе с недостатком *TPMT* лече стандардним дозама меркаптопурина, код њих се развија тешка и по живот опасна мијелотоксичност.

Циљ рада Циљ рада је био да се утврди да ли код деце с АЛЛ који су носиоци мутације у гену за *TPMT* индивидуализовањем дозирања меркаптопурина може да се смањи мијелотоксичност терапије, те да ли број тандемских поновака (енгл. *variable number of tandem repeats – VNTR*) у промотору гена за *TPMT* има утицаја на ефекте терапије меркаптопурином.

Метод рада Методима ланчане реакције умножавања ДНК (енгл. *polymerase chain reaction – PCR*) испитано је 50 насумично одабране деце лечене *ALL IC-BFM 2002* протоколом на најчешће мутације у гену за *TPMT*. За 20 деце је *PCR* методом одређен *VNTR* генотип. Испитаницима је током фазе одржавања бележен број недеља када су терапију добијали у пуним или смањеним дозама, као и број недеља без терапије.

Резултати Међу 50 деце било је 29 дечака (58%) и 21 (42%) девојчица, узраста од 1,8 до 17,3 године (медијана 6,2 године). Утврђено је четворо (8%) хетерозиготних носилаца мутација, код којих је откривена *TPMT*3A* варијанта. После 12, 14, 16 и 19 недеља лечења смањеним дозама меркаптопурина болесници су, због доброг подношења терапије, постепено почели да примају пуну дозу лека. Није било одлагања терапије. Смањење кумулативне дозе меркаптопурина за болеснике са *TPMT* мутацијама било је 7,8%, 7,4%, 11,2% и 16,6%. Између деце без *TPMT* мутација и хетерозигота није забележена статистички значајна разлика у трајању лечења пуним (53,6 насупрот 55,7 недеља) и смањеним дозама меркаптопурина (19,9 насупрот 15,2 недеље). Откривених *VNTR* било је између четири и седам. Већина болесника имала је различит број *VNTR* на хомологним хромозомима. Најчешће уочен полиморфизам био је *VNTR*5*. Није забележена корелација између наслеђивања *TPMT* и *VNTR* генотипа.

Закључак Фармакогенетским принципима у лечењу АЛЛ деце може се постићи напредак у подношењу лечења меркаптопурином.

Кључне речи: тиопурин-S-метилтрансфераза; фармакогенетика; акутна лимфобластна леукемија; деца

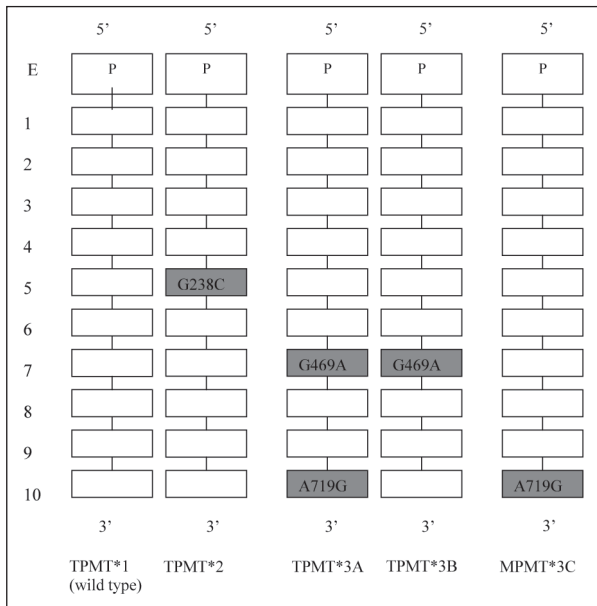
УВОД

Тиопурин-S-метилтрансфераза (*TPMT*) је цитосолни ензим који катализује S-метилацију или инактивацију ароматичних и хетероцикличних сулфхидрилних једињења у која се убрајају и лекови из групе тиопурина, као што су меркаптопурин, тиогуанин и азатиоприн [1]. Ови лекови се широко примењују у лечењу акутних леукемија, различитих врста запаљенских и аутоимунних болести, као и у трансплантационој медицини [2].

У већини испитаних популација белаца активност *TPMT* ензима показује тримодални распоред, па тако око 90% људи има високу, 10% смањену и око 0,3% слабу или немерљиву ензимску активност [1]. Оваква ензимска активност је условљена изразитим полиморфизмом у гену за *TPMT*. Хомозиготи за нормални алел имају нормалну ензимску активност, хетерозиготи за неки од полиморфизама смањену, док хомозиготи за полиморфизме имају слабу или немерљиву ензимску активност. Код особа са слабом активношћу *TPMT*, када се лече стандардним дозама тиопурина, испољава се тешка, потенцијално ле-

тална, хематопоетска токсичност [1]. Деца с акутном лимфобластном леукемијом (АЛЛ) која су хомозиготи за *TPMT* полиморфизме (мутације) могу се успешно лечити уколико им се даје 5-15% од уобичајених доза тиопурина, а да се при том не развију токсичне компликације [3]. Такође је показано да хетерозиготни носиоци мутација, због смањене ензимске активности, имају повећан ризик од развоја тиопуринске токсичности [4-8].

Ген за *TPMT* се налази на кратком краку хромозома 6, на позицији *p22.3*, а састоји се од десет егзона, од којих осам кодира протеин [9]. Досад је откривена 21 мутација у овом гену, од којих су неке повезане са смањеном ензимском активношћу [10-14]. Нормални алел или немутирани, функционални ген са високом ензимском активношћу, тзв. *wild type*, означава се са *TPMT*1*. Мутирани гени (мутирани алели) се означавају са *TPMT*2-22*, према редоследу којим су мутације откриване. Досадашња популациона истраживања су показала да три мутирана алела – *TPMT*2*, *TPMT*3A* и *TPMT*3C* – чине 80-95% свих дијагностикованих случајева са смањеном или слабом активношћу *TPMT* ензима [10]. *TPMT*2* алел садржи 238



СЛИКА 1. Најчешће алелске варијанте хуманог гена за *TPMT*: *TPMT**2 (мутација 238 G>C у егзону 5), *TPMT**3B (мутација 460 G>A у егзону 7), *TPMT**3C (мутација 719 A>G у егзону 10), *TPMT**3A (садржи две тачкасте мутације – 460 G>A и 719 A>G).

FIGURE 1. Most prevalent allele variants of human *TPMT* gene: *TPMT**2 (238 G>C mutation in exon 5), *TPMT**3B (460 G>A mutation in exon 7), *TPMT**3C (719 A>G mutation in exon 10), *TPMT**3A (contains two point mutations – 460 G>A and 719 A>G).

TPMT – тиопурин-S-метилтрансфераза; E – егзони; P – промотор
TPMT – thiopurine S-methyltransferase; E – egzons; P – promoter

G>C мутацију, *TPMT**3A две мутације (460 G>A и 719 A>G), док *TPMT**3C има само мутацију 719 A>G (Слика 1) [11]. Велики број студија је показао да у различитим испитиваним популацијама и етничким групама постоје значајне разлике у учесталости и врсти мутација у гену за *TPMT* [15].

Показано је да постоји корелација између *TPMT* генотипа и његове ензимске активности [16]. С обзиром на то да су есеји за одређивање ензимске активности компликовани и скупи и да зависе од великог броја различитих чинилаца, одређивање генотипа *TPMT* је данас суверен метод који се користи за процену ризика од испољавања мијелотоксичности током лечења тиопуринима [17, 18]. *PCR* анализа варијанти *TPMT* алела може се урадити брзо, једноставно и у сваком тренутку, јер резултат не зависи од примања трансфузије [17].

Осим мутација у кодирајућем региону гена за *TPMT*, полиморфизми у генском промотору утичу на активност ензима преко регулације транскрипције [19]. Истраживања промоторског региона открила су да и у овом сегменту *TPMT* гена постоје индивидуалне разлике које могу да доведу до разлика у активности ензима. У промотору су откривене три врсте узастопних поновака варијабилног броја (енгл. *variable number of tandem repeats* – *VNTR*), који могу бити дужине 17-18 bp, али првих 14 bp им је идентично [20]. Тандемски поновак 5'-GAGGCGGGGCGCGGAGA-3' се обележава са A, GAGGCGGGGCGCGGGCG-3' са B и

5'-GAGGCGGGGCGCGGAAA-3' са C. Ових тандемских поновака код различитих особа може да буде од три до девет, а постоји могућност варијација различитих врста у оквиру истог броја поновака, на пример, *VNTR**5a или *VNTR**5b [21]. Најчешћи алели у популацији су они који у промотору *TPMT* гена имају четири или пет поновака (*VNTR**4, *VNTR**5) [22]. У огледима *in vitro* је утврђено да мањи број поновака у промотору изазива већу активност тзв. репортер-гена и обрнуто [20]. Популациона истраживања су показала да постоји статистички значајна, обрнуто пропорционална корелација између активности *TPMT* ензима и укупног броја поновака (збира поновака с оба хромозома) [21].

ЦИЉ РАДА

Циљ рада је био да се утврди да ли код деце с АЛЛ који су носиоци мутације у гену за *TPMT* индивидуализовањем дозирања меркаптопурина може да се смањи мијелотоксичност терапије, те да ли *VNTR* генотип има утицаја на ефекте лечења меркаптопурином.

МЕТОД РАДА

Болесници

У истраживање је укључено 50 насумично одабране деце лечене по протоколу *ALL IC-BFM 2002* [23], који се примењује од новембра 2002. године за сву новодијагностиковану децу с АЛЛ у Србији. Истраживање је било проспективно с обзиром на то да је *TPMT* генотип одређен пре почетка лечења меркаптопурином. Крв болесника за анализу је узимана приликом рутинских посета болници, кад је венепункција обављана ради других анализа.

Фаза одржавања по протоколу *ALL IC-BFM 2002* траје 57-74 недеље, зависно од групе ризика која се одређује сходно протоколу [23]. Према истом протоколу, током терапије одржавања примењују се меркаптопурин (у дневној дози од 50 mg/m²) и метотрексат (у дози од 20 mg/m² једном недељно). Циљ ове терапије је да се постигне жељена леукопенија од 2-3×10⁹/l. Уколико се број леукоцита смањи испод 2×10⁹/l или се повећа изнад 3×10⁹/l, дозе оба лека се смањују, односно повећавају, у корацима од по 50% од постојећих. Када се број леукоцита смањи испод 1×10⁹/l, терапија се обуставља док се број леукоцита не повећа на 2×10⁹/l. Број леукоцита мањи од 2×10⁹/l је коришћен као вештачки одабрана граница за дефинисање мијелотоксичности.

Код болесника овог истраживања терапија одржавања је зависила од *TPMT* генотипа. Протокол је модификован за децу код које је откривена нека мутација у гену за *TPMT*. Њима је терапија започињана са 50% мањом дозом меркаптопурина и пуном до-

зом метотрексата. Крвна слика је контролисана једном недељно. Лечењем се број леукоцита одржавао у жељеном распону од $2-3 \times 10^9/l$. Уколико би број леукоцита био већи од $3 \times 10^9/l$, повећавана је само доза меркаптопурина у корацима од по 50% од постојеће.

Болесницима је контролисана крвна слика, процењивана мијелотоксичност и према њој модификована терапија. За сваког болесника је бележен број недеља када су добијали терапију меркаптопурином у пуној и смањеној дози, као и број недеља без терапије. Такође су израчунате кумулативне дозе за меркаптопурин и метотрексат.

Модификацију протокола за децу са мутацијом у гену за *TPMT* одобрио је национални координатор за протокол *ALLIC-BFM 2002*. Родитељи деце са *TPMT* мутацијама су дали писану сагласност да се њиховој деци модификује терапија одржавања.

Методи

Геномска ДНК је издвајана из периферне крви по методу Шина (*Shean*) и сарадника [24]. Сви узорци су анализирани на присуство мутација есејима заснованим на методима реакције ланчаног умножавања ДНК (енгл. *polymerase chain reaction* – *PCR*). Откривање мутација $460 G>A$ и $719 A>G$ је рађено методом *PCR-RFLP* (енгл. *restriction fragment length polymorphism* – *RFLP*), а мутације $238 G>C$ методом *PCR* специфичним за алел (*ARMS-PCR*) [10].

За децу код које је откривен $*3A$ мутирани алел анализирани су три најчешће мутације у овом гену и код њихових родитеља. Овим типом породичне сту-

дије може да се направи разлика између $*1/*3A$ хетерозигота и двоструких хетерозигота $*3B/*3C$ који имају две исте мутације ($460 G>A$, $719 A>G$), али су код првих обе смештене на једном хромозому, а код других на два хромозома. Овакво испитивање омогућава разликовање генотипа $*1/*3A$, који има смањену ензимску активност, од генотипа $*3B/*3C$, код којег је активност *TPMT* немерљива.

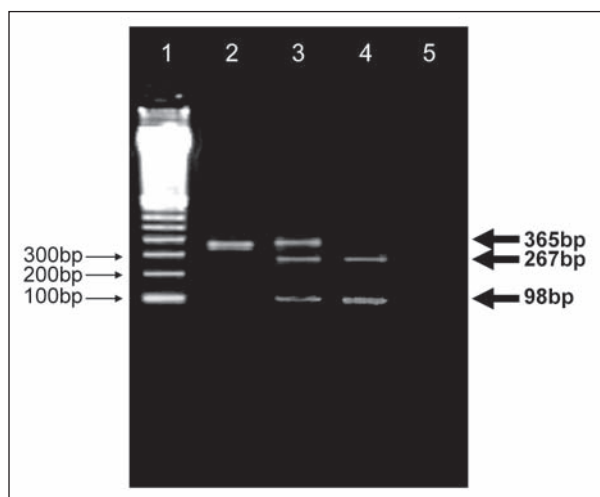
PCR амплификација промоторског региона *TPMT* гена урађена је по методу Јана (*Yan*) и сарадника [22].

Подаци добијени истраживањем су статистички обрађени помоћу програма *SPSS 10.0*. Број недеља када су даване пуне и смањене дозе, односно када су болесници били без терапије меркаптопурином бележен је за сваког болесника. Нормална расподела резултата испитана је Колмогоров-Смирновљевим методом. Средње вредности су поређене применом Студентовог *t*-теста за два независна узорка. Вредности за $p < 0,05$ су узимане као статистички значајне.

РЕЗУЛТАТИ

У групи од 50 испитане деце било је 29 дечака (58%) и 21 (42%) девојчица, узраста од 1,8 до 17,3 године (медијана 6,2 године). Међу њима је било четворо (8%) хетерозиготних носилаца мутација, код којих је откривена *TPMT**3A варијанта (Слике 2 и 3). Породичним студијама је доказано да је све четворо имало *TPMT**1/*TPMT**3A генотип (Слика 4), а не *TPMT**3B/*TPMT**3C.

Све четворо деце код којих су откривене *TPMT* варијанте током терапије одржавања лечено је модифи-

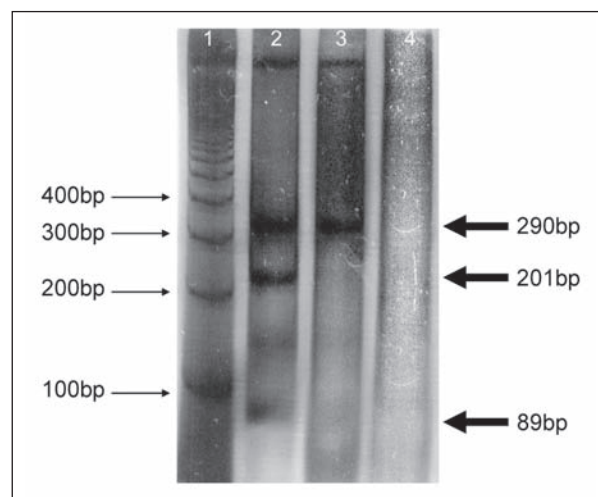


СЛИКА 2. Откривање мутације $460 G>A$ у гену за *TPMT* методом *PCR-RFLP*.

FIGURE 2. PCR-RFLP detection of *TPMT* $460 G>A$ mutation.

1 – маркер ДНК – „лествица“ од 100 базних парова; 2 – недигерирани *PCR* производ; 3 – хетерозиготни носилац мутације $460 G>A$; 4 – хомозигот за нормални алел $*1/*1$; 5 – контрола реакције *PCR*; bp – базни пар

1 – DNA marker – ladder of 100 base pairs; 2 – undigested PCR fragment; 3 – heterozygous carrier of the mutation $460 G>A$; 4 – homozygote for wild type $*1/*1$ allele; 5 – water control (PCR amplification done in the absence of the template); bp – base pair

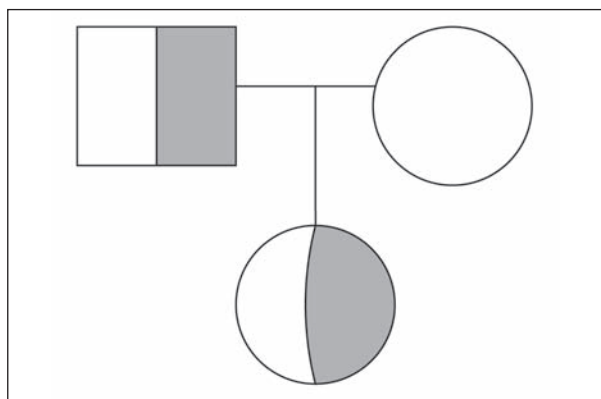


СЛИКА 3. Откривање мутације $719 A>G$ у гену за *TPMT* методом *PCR-RFLP*.

FIGURE 3. PCR-RFLP detection of *TPMT* $719 A>G$ mutation.

1 – маркер ДНК – „лествица“ од 100 базних парова; 2 – хетерозиготни носилац мутације $719 A>G$; 3 – хомозигот за нормални алел $*1/*1$; 4 – контрола реакције *PCR*; bp – базни пар

1 – DNA marker – ladder of 100 base pairs; 2 – heterozygous carrier of the mutation $719 A>G$; 3 – homozygote for wild type $*1/*1$ allele; 4 – water control (PCR amplification done in the absence of the template); bp – base pair



СЛИКА 4. Потврда генотипа *TPMT*1/TPMT*3A* кроз породичну студију.

FIGURE 4. Pedigree of patents with *TPMT*1/TPMT*3A* genotype.

кованим протоколом (видети Метод рада). Код њих је терапија одржавања започета са половином дозе меркаптопурина предвиђене протоколом и пуном дозом метотрексата. Ни код једног болесника терапија није прекидана због мијелотоксичности. После 12, 14, 16 и 19 недеља лечења смањеним дозама меркаптопурина, код свих болесника је, због доброг подношења на овај начин дозираних терапија, постепено почела да се примењује пуна доза овог лека. Кумулативне дозе лекова током фазе одржавања су изражене у проценту од пуних кумулативних доза које предвиђа протокол, а не у недељама, с обзиром на то да је, сходно групи ризика, трајање фазе одржавања различито. Смањење кумулативне дозе меркаптопурина за сваког болесника појединачно је било 7,8%, 7,4%, 11,2% и 16,6% од пуне дозе. Дозе метотрексата за ово четворо болесника су биле пуне, будући да током терапије одржавања није забележена леукопенија, због које би било потребно или смањити дозу лека или обуставити терапију (Табела 1).

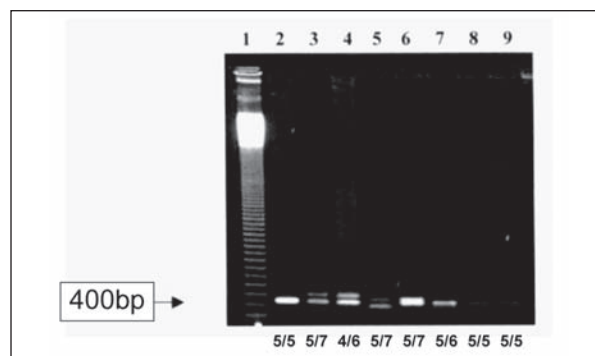
Између деце без *TPMT* мутација и хетерозигота није постојала статистички значајна разлика у трајању терапије пуних (53,6 наспрот 55,7 недеља) и смањеним дозама меркаптопурина (19,9 наспрот 15,2 недеље).

Промотор *TPMT* гена је анализиран за 20 деце укључене у студију. Откривених *VNTR* било је између четири и седам. Већина болесника имала је различит број *VNTR* на хомологим хромозомима (Сли-

ка 5). Најчешће установљен полиморфизам био је *VNTR*5*. Није забележена корелација између наслеђивања *TPMT* и *VNTR* генотипа.

Током истраживања је анализиран и промотор гена за *TPMT* болесника код којег се испољавала изражена резистенција на лечење меркаптопурином. При највећој дози меркаптопурина (150% терапијске дозе) број леукоцита код овог детета је константно био знатно већи од $3 \times 10^9/l$. Ово је индиректно указивало на повећану активност *TPMT* ензима. Један од разлога за то могла би бити повећана експресија гена за *TPMT*, односно појава додатних појачивачких (активаторских) регулаторних елемената у промотору, ДНК регулаторном елементу који је лоциран узводно од првог егзона овог гена. Применом *PCR* умножен је фрагмент дужине 422 bp, од чега 243 bp припада проксималном промоторском региону у којем су смештени *VNTR*, а остали део обухвата егзон *TPMT* гена (Слика 6).

Директно секвенцирање *PCR* производа је показало да анализирани промотор има истоветан број (пет) *VNTR* на оба хромозома, да су тандемски поновци истоветно поређани на оба хромозома у виду *VNTR*5a* алела (алел са пет поновака архитекту-



СЛИКА 5. Анализа броја тандемских поновака (*VNTR*) у промотору гена за *TPMT* *PCR* методом.

FIGURE 5. PCR detection of variable number of tandem repeats (*VNTR*) in the *TPMT* gene promoter.

1 – маркер ДНК – „лествица“ од 50 базних парова; 2 – *VNTR*5/VNTR*5*; 3 – *VNTR*5/VNTR*7*; 4 – *VNTR*5/VNTR*7*; 5 – *VNTR*4/VNTR*6*; 6 – *VNTR*5/VNTR*6*; 7 – *VNTR*5/VNTR*7*; 8 – *VNTR*5/VNTR*5*; 9 – *VNTR*5/VNTR*5*; bp – базни пар

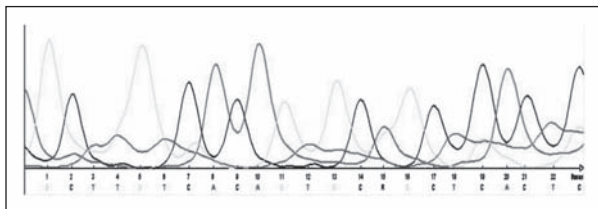
1 – DNA marker – ladder of 50 base pair; 2 – *VNTR*5/VNTR*5*; 3 – *VNTR*5/VNTR*7*; 4 – *VNTR*5/VNTR*7*; 5 – *VNTR*4/VNTR*6*; 6 – *VNTR*5/VNTR*6*; 7 – *VNTR*5/VNTR*7*; 8 – *VNTR*5/VNTR*5*; 9 – *VNTR*5/VNTR*5*; bp – base pair

ТАБЕЛА 1. Клинички подаци за болеснике хетерозиготне носиоце мутација у гену за *TPMT*.

TABLE 1. Clinical data of heterozygous *TPMT* mutation carriers.

Болесник Patient	Терапијска грана Therapy branch	Фазе одржавања (недеље) Maintenance phase (weeks)	Лечење смањеном дозом 6- <i>MP</i> (недеље) Therapy with reduced dose of MP (weeks)	Без терапије (недеље) No therapy (weeks)	Смањење кумулативне дозе 6- <i>MP</i> Reduction in cumulative dose of MP	Смањење кумулативне дозе метотрексата Reduction in cumulative dose of methotrexate
1	SR-1	74	12	0	7.8%	0%
2	IR-1	74	14	0	7.4%	0%
3	HR-1	58	16	0	11.2%	0%
4	IR-2	57	19	0	13.6%	0%

MP – меркаптопурин; *SR* – стандардни ризик; *IR* – интермедијарни ризик; *HR* – висок ризик
MP – mercaptopurine; SR – standard risk; IR – intermediate risk; HT – high risk



СЛИКА 6. Графички приказ дела секвенце PCR фрагмента дугог 422 bp у проксималном промоторском региону у којем су смештени VNTR.
FIGURE 6. DNA sequence of 422 bp PCR fragment comprising VNTRs within the proximal promoter region of TPMT gene.

VNTR – варијабилни број тандемских поновака
VNTR – variable number of tandem repeats

ре типа A_2-B_2-C) и да на позицији -183 постоји промена у виду замене базе ($T>G$) у односу на тзв. *wild type* секвенцу.

ДИСКУСИЈА

TPMT је главни ензим који у хематопоетском ткиву катаболише тиопурине, лекове који се широко примењују у лечењу акутних леукемија код деце. Ген за TPMT који кодира ензим одређене активности се наслеђује аутозомно кодоминантно и испољава генски полиморфизам, што је потврђено у свим досад обављеним студијама које су обухватиле велики број испитаника.

Испитивања фреквенције мутираних TPMT алела су показала да постоје међуетничке разлике у њиховој расподели. Ове разлике су нарочито уочљиве у поређењу припадника беле расе и популација са Далеког истока, јер се код ових других најчешће јавља мутирани алел TPMT*3C, док се остали мутирани алели или уопште не појављују или је учесталост њиховог појављивања занемарљиво мала. Код припадника беле расе најчешћи је мутирани алел TPMT*3A, док најмању учесталост има мутирани алел TPMT*3B (Табела 2). Међу нашим испитаницима пронађена су четири хетерозиготна носиоца TPMT*3A варијанте, односно 4% алелске варијанте TPMT*3A. У популационој студији здравих испитаника у Србији забележена је учесталост TPMT*3A алела од 3,25% [8], што је у складу с раније објављеним подацима за суседне словенске народе (3,6% код Бугара и 4,1% код Словенаца) [25, 26].

За све особе које су хетерозиготи за мутирани алел TPMT*3A (460 G>A, 719 A>G мутације се налазе на истом хромозому, док је на другом „здрав“ (*wild type*) алел, неопходно је урадити породична испитивања, да би се показало да евентуално није у питању двоструки хетерозигот TPMT*3B/TPMT*3C (460 G>A мутација се налази на једном, а 719 A>G мутација на другом хромозому). Код двоструких хетерозигота ниво TPMT је низак и испољава се тешка мијелотоксичност када се лече стандардним дозама тиопурина [8, 27]. Породична истраживања урађена код нас су показала да је у свим случајевима заиста била реч о генотипу TPMT*1/*3A, односно да су сви испитаници

имали по један функционалан TPMT алел. Овакав налаз је очекиван јер се у нашој популацији, као и код осталих народа беле расе, TPMT*3B/*3C генотип налази изузетно ретко. У овој студији алел *3B није откривен, али се показало да се у нашој здравој популацији, као и код Словенаца, ретко јавља мутација 460 G>A (Табела 2). Извођење породичних студија за нашу популацију је неопходно када се откривају удружене 460 G>A и 719 A>G мутације.

Наша студија је показала да лечење хетерозигота за TPMT смањеним дозама меркаптопурина омогућава смањење одлагања терапије (Табела 1). Хетерозиготним болесницима не само да терапија није одлагана, већ је им је након 12-19 недеља примене меркаптопурина у смањеним дозама он могао бити даван у пуним дозама, што је довело до смањења кумулативних доза овог лека од свега 7,8% до 16,6% (Табела 1). Осим TPMT генотипа, утицај на подношење терапије тиопуринима имају и други фактори који утичу на TPMT активност. Неки лекови, као што су диуретици, могу да изазову инхибицију активности ензима и на тај начин повећају токсичност тиопурина [27]. Показано је да је код новорођенчади и болесника с уремјом виша TPMT активност [18, 28]. Најзад, значајан фактор регулације TPMT активности је ензимска индукција од стране меркаптопурина. Еритроцитна TPMT активност се повећава са медијаном од 33% три месеца од почетка лечења меркаптопурином код деце с АЛЛ [29]. Механизам ове ензимске индукције досад није објашњен. Лошије подношење меркаптопурина након периода дужег одлагања терапије могло би се објаснити изостанком феномена ензимске индукције супстратом. У светлу ове чињенице сматрамо да је могуће искористити феномен ензимске индукције код особа са смањеном активношћу TPMT, ако се терапија не би одлагала.

Одлагање терапије током фазе одржавања је значајан фактор ризика за појаву рецидива код АЛЛ [5, 30, 31]. Наши хетерозиготи за TPMT мутације нису се статистички значајно разликовали у погледу трајања терапије у пуним и редукованим дозама од деце без TPMT мутација (Табела 3). Ефикасност лечења меркаптопурином је управо пропорционална трајању континуиране примене овог лека током фазе одржавања. Интензивирање терапије може имати супротан ефекат на исход лечења, јер доводи до одлагања терапије [5]. Идеалан приступ оптимализовању терапије меркаптопурином би било индивидуализовање терапије у зависности од TPMT генотипа.

Протокол за АЛЛ предвиђа да се при испољавању мијелотоксичности истовремено пропорционално смање дозе оба лека који се дају током фазе одржавања. Наша модификација протокола за TPMT хетерозиготе омогућила је да се све време терапије одржавања дају пуне дозе метотрексата (Табела 1), што свакако доприноси успешности лечења.

Разноврсност VNTR генотипова у различитим популацијама, као и најновија сазнања да различит

ТАБЕЛА 2. Етничке варијације мутираних *TPMT* алела.
 TABLE 2. Ethnic variation in polymorphic *TPMT* alleles.

Етничка група Ethnic group	Аутор и година Author and year	Број алела Number of alleles	<i>TPMT</i> *2	<i>TPMT</i> *3A	<i>TPMT</i> *3B	<i>TPMT</i> *3C	
Британци белци British Caucasians	<i>Ameyaw, 1999</i>	398	0.5%	4.5%	0	0.3%	
Французи белци French Caucasians	<i>Ganiere-Monteil, 2004</i>	608	0.7%	3%	0	0.4%	
Немци белци German Caucasians	<i>Schaeffeler, 2004</i>	2428	0.2%	4.4%	0	0.4%	
Италијани Italians	<i>Rossi, 2001</i>	206	0.2%	4.0%	0	1.0%	
Американци Americans	<i>Hon, 1999</i>	Белци Caucasians	564	0.17%	3.2%	0	0.17%
		Афроамериканци Afro-Americans	484	0.4%	0.8%	0	2.4%
Колумбијци Columbians	<i>Isaza, 2003</i>	280	0.35%	3.57%	0	0	
Аргентинци Argentineans	<i>Larovere 2003</i>	294	0.7%	3.1%	0	0	
Југозападна Азија South Asian	<i>Collie-Duguid, 1999</i>	Белци Caucasians	198	0	1%	0	0.5%
		Кинези Chinese	384	0	0	0	4.5%
Тајланђани Thais	<i>Srimartpirom, 2004</i>	400	0	0	0	4.75%	
Сингапурци Singaporeans	<i>Kham, 2002</i>	Кинези Chinese	400	0	0	0	3%
		Малајци Malayans	400	0	0	0	2.3%
		Индијци Indians	400	0	0.5%	0	0.8%
Јапанци Japanese	<i>Kubota, 2001</i>	302	0	0	0	0.3%	
Кенијци Kenyaans	<i>McLeod, 1999</i>	202	0	0	0	5.4%	
Ганци Ghanians	<i>Ameyaw, 1999</i>	434	0	0	0	14.8%	
Пољаци Polish	<i>Kurzwawski, 2004</i>	716	0.4%	2.7%	0	0.1%	
Бугари Bulgarians	<i>Indjova, 2003</i>	626	0.25%	3.6%	0	0.25%	
Словенци Slovenians	<i>Milek, 2006</i>	-	0	4.1%	0.3%	0.5%	
Србија и Црна Гора Serbia and Montenegro	<i>Dokmanović, 2006</i>	400	0.25%	3.25%	0.5%	0	

TPMT – тиопурин-S-метилтрансфераза; *TPMT* – thiopurine S-methyltransferase

број *VNTR* у промотору може имати улогу у различитој активности *TPMT* ензима били су разлог да се обави анализа броја *VNTR* и код наших испитаника. *VNTR* генотип је одређиван код 20 болесника. Анализа *VNTR* генотипа код болесника са мутацијама у гену за *TPMT* је рађена са циљем да се пронађе корелација између одређеног *VNTR* и *TPMT* генотипа. Таква корелација није пронађена. Ограничавајући фактор у овој анализи би могао бити мали број испитаника, те је за неке релевантније закључке потребно извести испитивања на већем узорку.

Анализа *VNTR* у промотору гена за *TPMT* у неким случајевима може да објасни смањену осетљивост на лечење тиопуринима. Међу испитаницима овог истраживања је био и болесник код којег је забележена смањена осетљивост на терапију меркаптопурином. На оба хромозома било је пет *VNTR*, што не би могло да објасни ову појаву, јер се зна да је мањи збир поновака удружен с великом активношћу ензима. Налаз

замене базе типа (*T*→*G*) на позицији -183 у односу на тзв. *wild type* секвенцу могао би да буде узрок појачане активности ензима, мада би се ова претпоставка могла потврдити само кроз функционалне есеје.

Преживљавање деце оболеле од АЛЛ је скоро 90%. Даље побољшање резултата је све теже постићи, али је један од начина за унапређење успешног излечења деце с акутним леукемијама индивидуализовање терапије сходно принципима фармакогенетике.

ЗАКЉУЧАК

Резултати овог рада су показали да се код деце с АЛЛ и мутацијама у гену за *TPMT* модификовањем протокола лечења у смислу смањења доза меркаптопурина може смањити ризик од развоја мијелотоксичности и следствено прекидање терапије, те спречити развој инфекција опасних по живот. Ова-

ТАБЕЛА 3. Трајање терапије одржавања код деце с акутном лимфобластном леукемијом у пуним и смањеним дозама и без терапије у зависности од *TPMT* генотипа.**TABLE 3.** Duration of maintenance therapy with full, reduced dose and no therapy according to *TPMT* genotype in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia.

<i>TPMT</i> генотип (n) <i>TPMT</i> genotype (n)	Средње (опсег) трајање терапије (недеље) / Mean (range) duration of therapy (weeks)		
	Пуна доза Full dose	Смањена доза Reduced dose	Без терапије No therapy
*1/*1 (46)	53.6 (44-70)	19.9 (5-30)	3.5 (0-10)
*1/*3A (4)	55.7 (50-60)	15.2 (12-19)	0
<i>p</i>	>0.05	>0.05	<0.01
Средња разлика Mean difference	-2.1 [-9.3-5.1]	4.4 [-2.1-11.0]	3.4 [-0.7-6.1]

n – број болесника; [95% CI]; *n* – number of patients; [95% CI]

кав приступ индивидуализовању терапије код деце с АЛЛ је допринос даљем унапређену успешности њиховог лечења.

НАПОМЕНА

Овај чланак је резултат рада на пројекту 143051 Министарства за науку Републике Србије.

ЛИТЕРАТУРА

- Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980; 32:651-62.
- Varagić V, Milošević M. *Farmakologija*. 20th ed. Beograd: Elit Medica; 2005.
- Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, et al. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J Clin Oncol* 2001; 19(8):2293-301.
- Black AJ, McLeod HL, Capell HA, Powrie RH, Matowe LK, Pritchard SC. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med* 1998; 129:716-8.
- Relling MV, Hancock ML, Boyett JM, Pui C-H, Evans WE. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999; 93:2817-23.
- Banerjee S, Bishop WP. Evolution of thiopurine use in pediatric inflammatory bowel disease in an academic center. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43(3):324-30.
- Song DK, Zhao J, Zhang LR. *TPMT* genotype and its clinical implication in renal transplant recipients with azathioprine treatment. *J Clin Pharm Ther* 2006; 31(6):627-35.
- Dokmanović L, Urosević J, Janić D, et al. Analysis of thiopurine S-methyltransferase polymorphism in the population of Serbia and Montenegro and mercaptopurine therapy tolerance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ther Drug Monit* 2006; 28:800-6.
- Szumanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* 1996; 15:17-30.
- Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997; 126(8):608-14.
- Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, et al. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet* 1996; 58:694-702.
- Otterness D, Szumanski C, Lennard L, et al. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: Gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62:60-73.
- Hamdan-Khalil R, Allorge D, Lo-Guidice JM, et al. In vitro characterization of four novel non-functional variants of the thiopurine S-methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309(4):1005-10.
- Schaeffeler E, Eichelbaum M, Reinisch W, Zanger UM, Schwab M. Three novel thiopurine S-methyltransferase allelic variants (*TPMT**20, *21, *22) – association with decreased enzyme function. *Hum Mutat* 2006; 27(9):976.
- Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, et al. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 1999; 9(1):37-42.
- Coulthard SA, Howell C, Robson J, Hall AG. The relationship between thiopurine methyltransferase activity and genotype in blasts from patients with acute leukemia. *Blood* 1998; 92(8):2856-62.
- Lennard L, Chew TS, Lilleyman JS. Human thiopurine methyltransferase activity varies with red blood cell age. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52(5):539-46.
- McLeod HL, Krynetski EY, Willimas JA, Evans WE. Higher activity of polymorphic thiopurine S-methyltransferase in erythrocytes from neonates compared to adults. *Pharmacogenetics* 1995; 5:281-6.
- Ma XL, Wu MY, Hu YM, Zu P, Li ZG. Relationships between thiopurine methyltransferase gene polymorphisms and its enzymatic activity. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2006; 28(6):456-9.
- Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Fazio F, et al. Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogenetics* 1999; 9(2):189-98.
- Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Sabbagh N, et al. Detection of known and new mutations in the thiopurine S-methyltransferase gene by single strand conformation analysis. *Human Mut* 1998; 12:178-85.
- Yan L, Zhang S, Eiff B, et al. Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68(2):210-9.
- Sary J. *Moderni lecba detske leukemija*. *Vox Pediatrice* 2003; 9:16-20.
- Shean WP, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Bio Techniques* 1991; 10:506-13.
- Indjova D, Atanasova S, Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M, Svinarov D. Phenotypic and genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase polymorphism in the Bulgarian population. *Ther Drug Monit* 2003; 25(5):631-6.
- Milek M, Murn J, Jaksic Z, Lukac-Bajalo J, Jazbec J, Mlinaric-Rascan I. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: genotype to phenotype correlation in the Slovenian population. *Pharmacology* 2006; 77(3):105-14.
- Lysaa RA, Giverhaug T, Wold HL, Aarbakke J. Inhibition of human thiopurine methyltransferase by furosemide bendroflumethiazide and trichlormethiazide. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 49:393-6.
- Pazmiño PA, Sladek SL, Weinshilboum RM. Thioli S-methylation in uremia: erythrocyte enzyme activities and plasma inhibitors. *Clin Pharmacol Ther* 1980; 28:356-67.
- McLeod HL, Relling MV, Liu Q, Pui CH, Evans WE. Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 85(7):1897-902.
- Lilleyman JS, Lennard L. Mercaptopurine metabolism and risk of relapse in childhood lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1994; 343:1188-90.
- Lilleyman JS, Lennard L. Non-compliance with oral chemotherapy in childhood leukemia. An overlooked and costly cause of late relapse. *BMJ* 1996; 313:1219-20.

IMPORTANCE OF GENOTYPING OF THIOPURINE S-METHYLTRANSFERASE IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA DURING MAINTENANCE THERAPY

Lidija DOKMANOVIĆ¹, Dragana JANIĆ¹, Nada KRSTOVSKI¹, Branka ZUKIĆ², Nataša TOŠIĆ², Sonja PAVLOVIĆ²

¹University Children's Hospital, Belgrade; ²Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Belgrade

INTRODUCTION Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) is an enzyme that catalyses the inactivation of mercaptopurine (MP) which is widely used in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia (ALL) of childhood. Potentially fatal myelotoxicity may develop after standard doses of MP in TPMT deficient patients.

OBJECTIVES To establish if individually tailored doses of MP can reduce myelotoxicity in ALL patients carrying mutations in the TPMT gene. To establish if variable number of tandem repeats (VNTR) genotype influences the treatment effects of MP.

METHOD Fifty randomly selected patients treated according to ALL IC-BFM 2002 protocol were tested for most frequent TPMT gene mutations using PCR based methods. VNTR genotype was determined in 20 children by PCR methods. During the maintenance phase, we recorded the number of weeks when therapy was applied in either full doses, reduced doses or when patients were without any therapy.

RESULTS Fifty children were examined, 29 boys (58%) and 21 girls (42%); age ranged from 1.8-17.3 years (median 6.2 years). Four patients (8%) were heterozygous for TPMT mutations, all of them carrying the TPMT*3A variant. After 12, 14, 16 and 19 weeks of therapy with reduced doses of MP, the patients switched to full doses due to good tolerance. There

was no therapy omission. Cumulative dose of MP was reduced for 7.8%, 7.4%, 11.2% and 16.6%, respectively, in patients with TPMT mutations. No significant difference was found between children with no mutations and TPMT heterozygotes regarding full dose therapy (53.6 vs. 55.7 weeks, respectively) and reduced dose therapy (19.9 vs. 15.2 weeks respectively). The number of detected VNTRs ranged from four to seven. The majority of patients had different number of VNTRs on homologous chromosomes. Most frequently detected polymorphism was VNTR*5. No correlation was found between TPMT and VNTR genotype inheritance.

CONCLUSION Obeying pharmacogenetic principles in the treatment of childhood ALL may improve the tolerance of therapy with MP.

Key words: thiopurine S-methyltransferase; pharmacogenetics; acute lymphoblastic leukaemia; children

Lidija DOKMANOVIĆ
Univerzitetska dečja klinika
Tiršova 10, 11000 Beograd
Tel.: 011 2060 693; 2060 690
Faks: 011 2684 672
E-mail: lidija.dokmanovic@udk.bg.ac.yu

* Рукопис је достављен Уредништву 8. 10. 2007. године.