T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

AKUT LÖSEMİLİ HASTALARDAN TANI SIRASINDA ALINAN BLAST HÜCRELERİNİN CANLILIKLARI ÜZERİNE B12 VİTAMİNİ VE D VİTAMİNİNİN ETKİLERİ

DR. MİRAÇ BERFU TOKUÇ ÜLGEN

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2024

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

AKUT LÖSEMİLİ HASTALARDAN TANI SIRASINDA ALINAN BLAST HÜCRELERİNİN CANLILIKLARI ÜZERİNE B12 VİTAMİNİ VE D VİTAMİNİNİN ETKİLERİ

DR. MİRAÇ BERFU TOKUÇ ÜLGEN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN: PROF. DR. AHMET KOÇ

İSTANBUL 2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tüm tez süresince çalışmayı etik kurallara uyarak yaptığımı ve yine bu tezdeki bilgileri etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasında yer alan bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesinde detaylı olarak belirttiğimi, yine bu tezin yazımı ve çalışılması sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Miraç Berfu TOKUÇ ÜLGEN

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim ve uzmanlık tezi hazırlama sürecim boyunca bilgi birikimi ve deneyimleriyle bana yol gösterici olan saygıdeğer tez hocam Prof. Dr. Ahmet Koç'a;

Eğitimim süresince desteğini esirgemeyen, engin bilgi birikimlerinden faydalandığım ana bilim dalı başkanımız Prof. Dr. Serap Demircioğlu'na,

Asistanlık hayatım boyunca yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Figen Akalın'a,

Tez sürecimde benden desteklerini esirgemeyen Marmara Üniversitesi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji ekibine,

Tezimle ilgili tüm yardımları için Marmara Üniversitesi İmmunoloji Anabilim Dalı'ndan hocam Prof. Dr. Tunç Akkoç'a ve ekibine,

Tez projemin gerçekleşmesi için sağladıkları bütçe desteğinden dolayı Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Asistanlık sürecim boyunca yanımda olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tüm değerli hocalarım, uzmanlarım ve asistan arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, hayatımın her aşamasında yanımda olduklarını hissettiğim ve bildiğim annem Prof. Dr. Burcu Cantürk Tokuç ve babam Hakan Tokuç'a,

Bu uzun ve zor yolculukta sevgisi, ilgisi ve sabrı ile her daim yanımda olan, en yakın arkadaşım ve sevgili eşim Meriç Ülgen'e,

Eğitim sürecimde her zaman iyi ki dememi sağlayan, canım eşkıdemlerim Gizem Dikencik Cüceloğlu ve Selin Dinç Aktekin'e,

Tıp fakültesinin bana en güzel armağanları, her zaman yanımda olan canım arkadaşlarım Naz Güçlü, Hazal Sağkol Karaduman ve Seçkin Çelik'e,

Gençliğe ve hekimlere olan güveni sayesinde, mesleğiyle gurur duyan bir hekim olmamı sağlayan, yolumu aydınlatan ulu önder Mustafa Kemal Atatürk'e

Teşekkür ederim.

Miraç Berfu Tokuç Ülgen

İstanbul- 2024

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ…….. v
KISALTMALAR…… viii
ŞEKİL DİZİNİ…… ix
TABLO DİZİNİ…… x
ÖZET…… xi
ABSTRACT…….. xiii
1.GİRİŞ AMAÇ…… 1
2.GENEL BİLGİLER…….. 4
2.1 ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LÖSEMİLERİ…… 4
2.1.1 AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ…….. 4
2.1.1.1 Epidemiyoloji…… 5
2.1.1.2 Etiyoloji…….. 5
2.1.1.3 B hücreli ALL…… 6
2.1.1.4 T hücreli ALL…… 7
2.1.1.5 Tanı…… 7
2.1.1.6 Tedavi…… 8
2.1.2 AKUT MYELOİD LÖSEMİ…….... 10
2.1.2.1 Epidemiyoloji ve Etiyoloji…….. 10
2.1.2.2 Tanı ve Sınıflandırma…… 10
2.1.2.3 Tedavi…… 12
2.2. B12 VİTAMİNİ…….. 14
2.2.1 B12 Vitamini Metabolizması ve Biyokimyası…….. 14
2.2.2 B12 Vitamini Eksikliği…….. 16
2.2.2.1 B12 Vitamini Eksikliğinde Klinik Bulgular……... 17
2.2.2.2 B12 Vitaminin Eksikliğinde Biyokimyasal Etkiler…… 17
2.2.3 B12 Vitamini Tedavisi…….. 18
2.2.4 B12 Vitamini ve Kanser İlişkisi…… 19
2.3 D VİTAMİNİ……..... 20
2.3.1 D Vitamini Fizyolojisi……... 20
2.3.2 D Vitamini Eksikliği…… 22
2.3.2.1 D Vitamini Eksikliği Tanımı…….. 22
2.3.2.2 D Vitamini Eksikliği Sıklığı……... 22
2.3.2.3 D Vitamini Eksikliğinde Klinik Bulgular…….. 23
2.3.3 D Vitamini Tedavisi…….. 23
2.3.4 D Vitamini ve Kanser İlişkisi…… 24
3. HASTA VE YÖNTEM…… 25
3.1 HASTA SEÇİMİ…… 25
3.1.1 Çalışmaya dahil edilme kriterleri…….. 26
3.1.2 Çalışmadan dışlanma kriterleri…….. 26
3.2 YÖNTEMLER…… 26
3.2.1 Kemik iliği aspirasyonundan blast hücrelerinin izolasyonu……. 26

3.2.2 Deney gruplarının oluşturulması ve ko-kültür deneyleriyle analizleri……. 27
3.2.3 Annexin V ve PI (Propidium Iodide) ile Apoptoz Analizi…… 27
3.2.4 CFSE Boyama ile Proliferasyon Analizi …….. 28
3.3 İstatiksel Değerlendirme……... 28
4. BULGULAR…… 29
5. TARTIŞMA…….. 38
6. SONUÇLAR…… 43
7. KAYNAKÇA…… 45
8. EKLER…… 53

KISALTMALAR

25(OH)D vit. : 25 hidroksi D vitamini
AL : Akut Lösemi
ALL : Akut Lenfoblastik Lösemi
AML : Akut Miyeloblastik Lösemi
Ara-C : Sitozin-Arabinozid
ATO : Arsenik Trioksit
ATRA : All trans retinoik asit
B-ALL : B hücreli akut lenfoblastik lösemi
Ca : Kalsiyum
CD : Cell Differentiation
CyIg : Sitoplazma İmmunglobulinleri
DBP : D vitamini bağlayıcı protein
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
FAB : French-American-British sınıflandırması
FISH : Floresan in situ hibridizasyon
HKHN : Hematopoetik kök hücre nakli
IF : İntrensek Faktör
KML : Kronik Myelositik Lösemi
KMY : Kemik Mineral Yoğunluğu
MDS : Miyelodisplastik Sendrom
MMA : Metil malonik asidemi
MRD : Minimal rezidüal hastalık
P : Fosfor
PTH : Paratiroid hormon
RNA : Ribo Nükleik Asit
RT-PCR : Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
SAM : S-Adenozil Metiyonin
SIg : Membran yüzey immunglobulini
T-ALL : T hücreli akut lenfoblastik lösemi
TCA : Tri-Karboksilik Asit
TCII : Transcobalamin 2
THF : Tetra Hidro Folat
UVB : Ultra Viyole B
VDR : Vitamin D reseptörleri

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Homosisteinin Metiyonine dönüşümünde Kobalaminin rolü……. 13
Şekil 2: Metil Malonil-KoA'nın Süksinil-KoA'ya dönüşümü……. 16
Şekil 3: D Vitamini Sentezi…….. 21
Şekil 4: Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Seçim Diyagramı…….. 25
Şekil 5: B12 vitamini eklenen grupta Akım Sitometride Proliferasyon Değerlendirmesi örneği……. 33
Şekil 6: B12 vitamini eklenen grupta Akım Sitometride Annexin ile Canlılık, Apopitoz ve Ölü Hücre Değerlendirmesi örneği ……. 34
Şekil 7: Blast hücrelerinin 200 ng/L ve 400 ng/L B12 Vitamini konsantrasyonlarına yanıtları……. 35
Şekil 8: Blast hücrelerinin 20 µg/L ve 40 µg/L D Vitamini konsantrasyonlarına yanıtları……. 36

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Dünya Sağlık Örgütü ALL Sınıflaması…… 8
Tablo 2: French-American-British AML Sınıflaması……. 11
Tablo 3: Dünya Sağlık Örgütü AML Sınıflaması……... 12
Tablo 4: FDA onaylı B12 Vitamini Eksikliği Tedavi Endikasyonları…… 19
Tablo 5: Hastaların Yaş, Cinsiyet ve Akut Lösemi Tanılarının Dağılımı…….... 29
Tablo 6: Tanı Aşamasında Hastaların B 12 Vitamini Eksiklik Durumları……. 29
Tablo 7: Tanı Aşamasında Hastaların D Vitamini Eksiklik Durumları…….. 30
Tablo 8: Tanı Aşamasında Hastaların Folik Asit Eksiklik Durumları ……... 30
Tablo 9: Tanı Aşamasında Hastaların Kan Sayımı Bulguları Ortalama Değerleri……. 31
Tablo 10: Tanı aşamasında Hastaların bazı Biyokimyasal Parametrelerinin Ortalama Değerleri……... 31
Tablo 11: Blast hücrelerinin 200 ng/L ve 400 ng/L B12 Vitamini konsantrasyonlarına yanıtları…… 33
Tablo 12: Blast hücrelerinin 20 µg/L ve 40 µg/L D Vitamini konsantrasyonlarına yanıtları…… 36
Tablo 13: Tanı anındaki B12 vitamini değerleri ile tanı anındaki Hemogram değerleri ve Blast yüzdeleri arasındaki ilişki…….. 37

ÖZET

Amaç: Akut lösemiler (AL) çocukluk çağının en sık görülen kanserleridir. Ülkemizde B12 vitamini ve D vitamini eksikliklerinin yaygın olarak görülmesi nedeniyle AL tanısı alan hastalarda da bu vitamin eksiklikleri saptanmakta ve replasman tedavisi gerekmektedir. B12 Vitamini, DNA sentezinde ve protein sentezinde iki noktada kofaktör olarak kullanılmaktadır. D vitamini eksikliğinin kanser gelişim riskinde artış ile ilişkili olduğu ve D vitamininin insan miyeloid lösemi hücrelerinin in vitro büyümesini baskıladığı bildirilmiştir. Bu çalışmada in vitro olarak inkübe edilen blast hücreleri üzerine B12 vitamini ve D vitamininin etkilerinin gösterilmesi amaçlanmaktadır.

Yöntem: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematolojisi ve Onkolojisi Bilim Dalı'na başvuran 34 akut lösemi tanılı hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada kemik iliği aspirasyonundan elde edilen blast hücreleri beş farklı besiyeri ile proliferasyon ve canlılık analizleri için kültür edilmiştir. Birinci grup besiyerine hiçbir şey eklenmemiş (Kontrol grubu- B12 vitamini ve D vitamini eklenmeyen), ikinci gruba 200 ng/L B12 vitamini konsantrasyonu, üçüncü gruba 400ng/L B12 vitamini konsantrasyonu sağlanacak şekilde B12 vitamini, dördüncü gruba 20 µg/L D vitamini konsantrasyonu ve beşinci gruba 40 µg/L D vitamini konsantrasyonu sağlanacak şekilde D vitamini eklenmiştir. Bahsedilen besiyerleri ile kültür edilen blast hücreleri beş gün (120 saat) 37°C derecede inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinin ardından akım sitometri cihazı ile proliferasyon ve canlılık analizi yapılmıştır.

Bulgular: Özellikle 400 ng/L konsantrasyonunda olacak şekilde B12 vitamini eklenen besiyerlerindeki canlı hücre sayıları istatiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermiştir **(p=0,029).** Erken apopitoz fazında B12 vitaminin her iki düzeyinde de apopitozda benzer oranda ve istatiksel olarak anlamlı düzeyde azalma görülmüştür **(p: 0,001).** D vitamini eklenmeyen ve eklenen gruplarda, gruplar arasında proliferasyon ve canlılık akım sitometri ile değerlendirilmiş fakat istatiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (ikisi için de $p>0.05$).

Sonuç: Besiyerlerine B12 vitamini eklenen gruplarda in vitro ortamda B12 vitaminin blast hücrelerinin canlılığını artırdığı ve apoptozunu azalttığı, D vitaminin ise in vitro olarak blast hücrelerine önemli bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Çalışma sonuçlarımız akut lösemi hastalarının tanı aldıktan sonra eksikliği saptanması durumunda B12 vitamini tedavisi

verilmesini desteklememekte, D vitamini tedavisi verilmesini ise desteklemektedir. Daha fazla hasta sayısıyla in vitro ortamda benzer prospektif çalışmalar yapılması bulgularımızı destekleyecektir.

Anahtar Kelimeler: Akut Lösemi, B12 vitamini, D vitamini, Blast, Akım sitometri, Proliferasyon, Canlılık, Apopitozis, in vitro, çocuk.

ABSTRACT

Objective: Acute leukemias (AL) are the most commonly seen type of cancer in childhood. Due to the widespread occurrence of vitamin B12 and vitamin D deficiencies in our country, vitamin deficiencies are commonly detected in patients diagnosed with AL, necessitating replacement therapy. Vitamin B12 is used as a cofactor at two points in DNA synthesis and protein synthesis. Vitamin D deficiency has been reported to be associated with an increased risk of cancer development and to suppress the in vitro growth of human myeloid leukemia cells. This study aims to demonstrate the effects of vitamin B12 and vitamin D on blast cells incubated in vitro.

Methods: A total of 34 patients diagnosed with acute leukemia who applied to the Department of Pediatrics, Hematology, Faculty of Medicine, Marmara University, were included in the study. Blast cells obtained from bone marrow aspiration were cultured with five different culture media for proliferation and viability analyses. No additions were made to the first group culture medium (Control group - no addition of vitamin B12 and D vitamin). Vitamin B12 was added to provide vitamin B12 at a concentration of 200 ng/L to the second group and 400 ng/L to the third group. Vitamin D was added to provide vitamin D at a concentration of 20 µg/L to the fourth group and at a concentration of 40 µg/L to the fifth group. Blast cells cultured with the mentioned culture media were incubated for five days (120 hours) at 37°C. Proliferation and viability analysis were performed using flow cytometry after the incubation process.

Results: The number of live cells in culture media supplemented with vitamin B12, especially at a concentration of 400 ng/L, showed a statistically significant increase ($p=0.029$). In the early apoptosis phase, there was a similar and statistically significant decrease in apoptosis at both levels of vitamin B12 (p: 0.001). In groups with and without added vitamin D, proliferation and viability were evaluated by flow cytometry, but no statistically significant difference was found between the groups ($p>0.05$ for both).

Conclusion: In groups which vitamin B12 was added to culture media, it was shown that vitamin B12 increased the viability of blast cells and reduced apoptosis in vitro, while vitamin D did not have a significant effect on blast cells in vitro. Our study results do not support the administration of vitamin B12 therapy to acute leukemia patients if deficiency is

detected after diagnosis, but suggests the administration of vitamin D therapy. Further prospective studies with a larger number of patients in an in vitro environment will support our findings.

Keywords: Acute Leukemia, Vitamin B12, Vitamin D, Blast, Flow cytometry, Proliferation, Viability, Apoptosis, in vitro, child.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut lösemiler (AL) çocukluk çağı kanserleri içinde en yaygın olandır (1-3). Amerika Birleşik Devletleri'nde 15 yaşından küçüklerde Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) görülme sıklığı 3.4/100000'tür (1, 4). ALL en sık 2-6 yaşlar arasında izlenirken, Akut Miyeloblastik Lösemi (AML) sıklığı 0-2 yaş ve adölesan yaş grubunda pik yapar.

Akut lösemi şüphesi olan hastalarda kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisinin mikroskopla incelenmesi, moleküler testler, sitogenetik analizi ve immünfenotipleme ile kesin tanı koyulabilmektedir (1, 2, 4). Akut lösemilerde karakteristik olarak periferik kan bulgularında anemi, trombositopeni ve periferik yaymada blastik hücreler görülür. Ancak ilk tanı anında hastaların %20'sinde periferik kan tablosu normal olarak bulunabilmektedir. Akut lösemilerde lökosit sayısı normal, yüksek veya düşük olabilir. Tanı anında olguların %50'sinde artmış, artanların %20'sinde 100000/ mm^3'ün üzerindedir. Vakaların %30'unda ise lökopeni bildirilmektedir (1, 5).

ALL tanısı için kemik iliği aspirasyon örneğinde blastik hücre popülasyonunun %25'in üzerinde, AML tanısı için ise %20'nin üzerinde olması gerekir. Akut lösemide kemik iliği genellikle hücreden zengin olup yaygın bir şekilde tek tip blastik hücre ile infiltredir. Eritroid ve megakaryositer seri belirgin derecede azalmıştır (1, 5).

Ülkemizde 0-18 yaş grubunda B12 vitamini ve D vitamini eksikliği yaygın olarak görülmektedir (6-9). Toplumda yaygın olarak görülmesi nedeniyle yeni AL tanısı alan hastalarda da yaygın olarak B12 ve D vitamin eksiklikleri görülmekte ve replasman tedavisi gerekmektedir (7, 9-11). Bu nedenlerle akut lösemi (AL) tanısı alan hastaların tedavi süreci başlarken rutin tarama amaçlı gönderilen tetkiklerde B12 vitamini (Kobalamin) ve D vitamini (25-hidroksi Vitamin D) düzeyleri bakılmaktadır. Hastalarda vitamin eksikliği saptanması durumunda, hastanın AL tedavi protokolüne göre belirli zamanlarda vitamin replasman tedavileri eklenmektedir.

Marmara Üniversitesi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı'na başvuran ve AL tanısı alan hastalarda geriye dönük olarak yapılan bir incelemede B12 vitamini ve D vitamini eksikliği sıklığı yüksek bulunmuştur. 2017-2020 yılları arasında taranan 88 AL tanılı

hastanın %51'nin tanı anında B12 vitamini eksikliği olduğu görülmüştür(12). 88 hastanın 65'inde (%80.2) D vitamini düzeyi düşük bulunmuş, 45'inde (%55.5) ise ağır D vitamini eksikliği saptanmıştır (12). Bu sebeple AL tanısı alan hastalarımızın çoğuna vitamin replasman tedavisi düzenlenmektedir.

B12 vitamini, DNA sentezinde ve protein sentezinde 2 noktada kofaktör olarak kullanılmaktadır. İlk olarak, metiyonin sentaz enzimi homosisteinin metiyonine dönüşümünde metilkobalamini kofaktör olarak kullanmaktadır. Bu metilasyon reaksiyonu sırasında bir metil grubunun aktarılmasıyla pürin ve pirimidin sentezinde kullanılan tetrahidrofolat oluşmaktadır (13). İkinci olarak, metilmalonil Coa mutaz enzimi 5-deoksi adenozilkobalamini kofaktör olarak kullanarak, metilmalonil CoA- süksinil CoA dönüşümü sağlanmaktadır. Bu reaksiyonda oluşan süksinil KoA Krebs döngüsü aracılığıyla protein sentezinde kullanılmaktadır (13).

Bu sebeple B12 vitamini eksikliği saptansa dahi, DNA sentezinde ve protein sentezinde enzim kofaktörü olarak kullanıldığı için, blastlarda da DNA sentezini desteklediği ve protein sentezini artırarak blastların hayatta kalma, bölünme ve çoğalma şansını artıracağı düşünülerek, hastada remisyon sağlanana kadar B12 vitamini eksikliği tedavi edilmemektedir. Fakat hastalar remisyon dönemine girene kadar B12 tedavisi alamadığı için, hastaların B12 vitamini eksikliğine maruziyeti artmaktadır. Çocukluk döneminde B12 vitamini eksikliğinin hem büyümeyi hem de nörokognitif gelişimi etkilediği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (14, 15). Sneha Tandon ve ekibi, Hindistan'da yeni AL tanısı alan 58 çocukta yaptıkları araştırmada tanı anındaki B12 vitamini ve folat düzeyinin tedaviyle ilişkisini değerlendirmiştir. Tanı anında B12 vitamin eksikliği olan hastaların, tedavi protokolünün indüksiyon döneminde kemoterapi yan etkilerini daha ağır yaşadığı görülmüştür. Bu araştırmada indüksiyon dönemi öncesinde B12 vitamini replasmanı vermenin hastayı toksik etkilerden korumak için önemli olduğu gösterilmiş olmakla beraber, tartışma bölümünde B12 vitamini tedavisinin kemoterapinin blast hücreleri üzerindeki etkisini azaltmasından çekinildiği de vurgulanmıştır (16). Minnet ve ark. tarafından yapılmış çalışmada (17) B12 vitamini eksikliği olan hastalarda mononükleer hücrelerde DNA hasarının arttığı ve B12 vitamini tedavisinin DNA hasarını azalttığı gösterilmiştir. Bu etkinin lösemik blastlar üzerinde kemoterapinin yol açacağı DNA hasarını azaltma şeklinde ortaya çıkabilmesi de muhtemeldir.

D vitamini eksikliğinin kanser gelişim riskinde artış ile ilişkili olduğu, kendisinin veya metabolitlerinin bazı kanser hücrelerine sitotoksik etki gösterdiği veya insan miyeloid lösemi hücrelerinin in vitro büyümesini baskıladığı bildirilmiştir (18, 19). Bu nedenle pek çok klinikte, D vitamini eksikliğinin, akut lösemi hastalarındaki prognoz üzerine de etkili olabileceği düşünülerek, tedavi öncesinde D vitamini taraması her lösemi hastasında yapılmaktadır (8). 25-OH Vitamin D'nin, bilinen bir hücre proliferasyonu etkisi olmadığı için, eksikliği saptanması durumunda doğrudan D vitamini replasman tedavisi başlanmaktadır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda hematolojik malignite tanısı nedeniyle kemoterapi alan çocuklarda, vitamin D eksikliğinin uzun dönemde uzun kemik fraktürlerine eğilimi ve osteoporoz riskini artırdığı saptanmış olup D vitamini tedavisinin, vitamin eksikliği saptandığı anda başlanması önerilmektedir (20, 21).

D vitamini, kalsiyum ve fosforun bağırsak emilimini ve kemik mineralizasyonunu arttırıcı etki gösterir (11). Literatürdeki bazı çalışmaların sonuçlarına göre ALL hastalarında neoplazinin başlangıcından beri D vitamini eksikliği vardır ve kısmen tümör nekroz faktörü ile ilişkili sitokinler nedeniyle tüm tedavi boyunca korunur (21). Aynı yazarlara göre, ALL'li çocuklar, hastalıklarının başlangıcında sağlıklı çocuklara kıyasla daha düşük bel ve kalça kemiği mineral yoğunluğuna (KMY) sahiptir (11, 21). Fakat, Antony ve ark çalışmasında ise D vitamininin sinerjik etki ile kemoterapötiklerin etkisini artırması ve blast hücrelerinin viabilitesini azaltması beklenirken aksine ALL hücrelerini deksametazon etkisinden koruduğu bildirilmiştir (22). Literatürde, teorik olarak öngörülen, blast hücrelerinin D Vitamini ve B12 Vitamini ile ilişkisini gösteren yeterli sayıda klinik çalışma ve in vitro deneysel çalışma bulunmamaktadır. Yalnızca, çeşitli kanser türlerinde D vitamini reseptörlerinin (VDR) arttığı saptanmış ve bu durumun tedavi başarısıyla ilişkili olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (18, 19, 23-25).

Bu çalışmada değişen miktarlarda B12 vitamini ve D vitamini ile in vitro olarak inkübe edilen blast hücreleri üzerine B12 vitamini ve D vitamininin etkilerinin gösterilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla, yeni AL tanısı alan 0-18 yaş grubu çocuklardan alınan blast hücrelerinin, B12 Vitamini ve D vitamini içeren ve içermeyen besi yerlerindeki yaşamı ve değişimi izlenecek ve uzun vadede yeni AL tanısı alan hastalarda bu vitaminlerin eksikliğinin saptanması durumunda doğru vitamin replasman tedavisi ve zamanının belirlenmesi için bilimsel veriler sağlanmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LÖSEMİLERİ

Akut lösemiler çocukluk çağında en sık görülen neoplazilerdir. 15 yaşından küçük çocuklarda görülen malignitelerin %31'ni oluştururlar (1, 3, 26). Bu tanıların %82'sini akut lenfoblastik lösemi (ALL) oluşturur. Takiben %14 akut myelositik lösemi (AML) ve %3-4 kronik myelositik lösemi (KML) görülmektedir (27, 28).

Akut lösemiler; kemik iliğinde kan ve ekstrameduller bölgelerde biriken, lenfoid ve myeloid (granülositik, monositik, eritroid ve megakaryositik) öncül hücrelerinin diferansiyasyonunun erken bir evresinde duraklaması ve aşırı çoğalmasıyla karakterize malign bir neoplazidir (27). Hücre serilerindeki kontrolsüz proliferasyon ve apoptozisin azalmasının sonucu olarak normal kemik iliği fonksiyonları bozulur. Blastik hücreler kemik iliğini infiltre eder (1, 2). Bu blastik hücre grubu işlevsel olmadığından kemik iliği yetersizliği gelişir.

2.1.1 AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ

Akut lenfoblastik lösemi hem çocuklarda hem de yetişkinlerde görülmektedir ve en yüksek insidans 2 ila 5 yaş arasındadır. Çoğu akut lenfoblastik lösemi, sağlıklı bireylerde ortaya çıkar ve kalıtsal genetik duyarlılık veya çevresel maruziyet gibi yatkınlık faktörleri sadece birkaç hastada belirlenmiştir (4). Bu yatkınlık faktörleri lenfoid öncü hücrelerin farklılaşması ve çoğalmasına dahil olan kromozomal anormallikler ve genetik değişikliklerle karakterizedir. Bu genetik anormallikler tedavi cevabını belirlemede de önemli prognostik faktörlerdir. Hastalık risk sınıflaması ve yoğunlaştırılmış kemoterapi protokollerinin geliştirilmesi, özellikle çocuklarda (1–14 yaş), adolesan ve genç erişkinlerde (15–39 yaş) akut lenfoblastik lösemi hastalarının sonuçlarını önemli ölçüde iyileştirmiştir (28, 29).

2.1.1.1 Epidemiyoloji

Çocuklarda en yaygın hematolojik malignite akut lösemidir. Çocukluk çağında ALL insidansı 3-4/100000 olarak bildirilmektedir (1). Erkeklerle kadınlar arasındaki oran yaklaşık 1.2:1'dir ve bu hastalık daha sık çocuklarda rapor edilmektedir (26). Yaşa özgü insidans en yüksek olarak 1–4 yaş arasındaki çocuklarda görülür, ardından çocukluk (5–14 yaş), ergenlik ve genç erişkinlik (15–39 yaş) dönemlerinde hızla düşer ve en düşük noktaya 25 ila 45 yaş arasında ulaşır (28). Bu yaş aralığından sonra bu hastalığın insidansında sadece küçük bir artış görülür. Akut lenfoblastik lösemi vakalarının yaklaşık %60'ı 20 yaşın altında teşhis edilir. Son dönemde tedavi başarısı önemli ölçüde iyileşmiş olup, 1975'te %31 olan 5 yıllık genel sağ kalım oranı 2019'da neredeyse %80'e yükselmiştir (26, 30).

2.1.1.2 Etiyoloji

Çoğu akut lenfoblastik lösemi sağlıklı bireylerde ortaya çıksa da, bazı hastalarda kalıtsal genetik duyarlılık ve çevresel risk faktörleri belirlenmiştir (27).

Birkaç genetik sendromun, çocukluk çağında akut lenfoblastik lösemiye yatkınlığa neden olduğu bildirilmiştir. Bu hastalıklar arasında, Down sendromu, Fanconi anemisi, Bloom sendromu, Ataksi Telenjiektazi hastalığı, Nijmegen sendromu, Kostman hastalığı, Nörofibramatozis tip1, Diamond-Blackfan anemisi yer alır. Ek olarak kalıtsal bazı gen varyantları da (TLX1, LYL1, ETP, TAL1, TLX3, CRLF2, BCR-ABL1, TCF3-PBX1, ARID5B, IKZF1, CEBPE, CDKN2A-2B, PIP4K2A, ETV6, Robertsonian translokasyonu rob (15;21)) lösemiye yatkınlığa sebep olur(31, 32). Bu nedenle, genetik temelin poligenik olduğu görünmektedir. Bu hastalık için genom çapında birliktelik çalışmalarında tanımlanan genler doğrudan kan hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynar, bu da kalıtsal genetik varyantın muhtemelen hematopoetik hücrelerin genetik duyarlılığına doğrudan katkıda bulunduğunu ve intrauterin ile postnatal olarak tümörogenesis başlatma ve teşvik etme süreçlerine yol açtığını düşündürmektedir. Önemli bir nokta olarak, genetik duyarlılık taraması önerilmez çünkü ilişkili genetik varyantlara sahip çoğu çocuk, akut lenfoblastik lösemi geliştirmeyeceklerdir (31).

Çevresel etmenler epidemiyolojik olarak incelendiğinde bazı çocukluk çağı lösemilerinin intrauterin başlayabileceği öne sürülmüştür ve lösemisi olan öz ikizlerde, klonalite moleküler çalışmalar tarafından güçlü bir şekilde desteklenmiştir (31). Bu nedenle,

gebelik ve çocukluk döneminde bazı çevresel faktörlere maruz kalmanın lösemi üzerindeki etkisi araştırılmıştır (32). Bu etkenler arasında özellikle pestisid maruziyeti, alkilleyici ajanlara maruziyet, benzen inhalasyonu, iyonize radyasyona maruz kalmak ve çocukluk çağı enfeksiyonları ön plana çıkmaktadır (33).

2.1.1.3 B hücreli ALL

ALL'de immünfenotip sınıflandırması, lenfoblastların yüzeyinde ve sitoplazmasında bulunan spesifik antijenlere (CD: cell differentiation) göre yapılmaktadır. ALL immunofenotipik olarak Prekürsör B (pro-B, erken pre-B, pre-B, transizyonel B) ve matür B olarak sınıflandırılır (28, 34-37).

- **Pro-B ALL:** Tüm ALL'ler arasında %3-4 sıklıkla görülür. Çok immatür B hücre öncüllerinden oluşur. CD10 ve sitoplazma immunglobulinleri (cyIg) negatif blastları içerir. İnfantlarda en sık görülen ALL tipidir. Özellikle kromozom 11q23 ile ilişkilendirilmektedir.
- **Erken pre-B ALL:** En sık görülen tiptir. Pro-B ALL öncüllerinden daha matür, CD10 ve CD19 pozitif ancak cyIg negatiftir. CALLA pozitif "Common ALL" olarak da isimlendirilmektedir(35).
- **Pre-B ALL:** Cylg ve CD10 pozitifliği ile karakterizedir fakat yüzey immunglobulini (sIg) bulunmadığı için matür B hücreli ALL olarak sınıflandırılmamaktadır. CD19, CD22 pozitiftir. Özellikle kromozom (1;19) (q23p13) translokasyonu ile ilişkilendirilir.
- **Transizyonel (geç) pre-B ALL:** Matür B hücreli ALL öncesidir. Tüm ALL'lerin sadece %1'i bu tiptedir. (37).
- **Matür B hücreli ALL:** Çocukluk çağı ALL arasında % 1-2 olarak izlenir. Burkitt lösemi olarak da adlandırılır. Membran yüzey immunglobulini (sIg) bulunur. Hastaların çoğunda t(8;14) (q24;q32) bulunur. Merkezi sinir sistemi tutulum insidansı daha yüksektir. Prognozu en kötü olan alt tiptir (36).

2.1.1.4 T hücreli ALL

T hücreli akut lenfoblastik lösemi çocukluk çağı ALL'ler arasında %10-15 sıklıkla gözlenir. T-ALL genetik mutasyonların biriktiği ve timopoez sırasında hücre büyümesi, farklılaşma, çoğalma ve yaşamın normal kontrolünü değiştirdiği çok aşamalı bir sürecin bir sonucudur (28). B-ALL'ye göre adölesan grupta daha yaygındır ve yüksek lökosit sayısıyla başvurular sıktır (36). Ekstramedüller tutulum B-ALL'ye kıyasla daha sıktır. CD7 pozitifliği görülür. T-ALL'de blastlar CD2, CD3, CD5 ve CD7 pozitifitir. Bunların dışında CD8, CD4 ve CD1a da T hücre belirteci olarak görülmektedir. Cd1a pozitifliği T lenfoblastların öncül niteliğini gösterir. CD10 genellikle negatiftir (37).

Bu hastalığın genetiği son derece heterojendir ve hemen hemen tüm hastalarda kromozomal anormallikler bulunmaktadır (38). NOTCH1'de aktive edici mutasyonlar veya FBXW7'de fonksiyon kaybı mutasyonları T-ALL tanılı hastaların yaklaşık %80'inde bulunan ana onkojenik yoludur (38, 39). T-ALL hastalarının yaklaşık %50'sinde, kromozomal translokasyonlar ve transkripsiyon faktör genleri rol oynar. En çok ifade edilen onkojenik transkripsiyon faktörleri arasında TAL1, TAL2, LYL1, OLIG2, LMO1, LMO2, TLX1 (HOX11), TLX3 (HOX11L2), NKX2-1, NKX2-2, NKX2-5, HOXA genleri, MYC, MYB ve TAN1 bulunmaktadır (28, 39, 40). Genetik değişiklikler, T hücreli akut lenfoblastik lösemi tanılı hastalarda sinyal iletim yollarında da gözlemlenir. Bunlar arasında PI3K-AKT sinyal iletim yolunun temel düzenleyicisi olan PTEN'in mutasyonel kaybı (hastaların %5-10'u), (40) ve ABL1'in NUP214, EML1 ve ETV6 ile gen füzyonları oluşturmak üzere yeniden düzenlenmesi (hastaların yaklaşık %8'i) bulunmaktadır (28, 41).

2.1.1.5 Tanı

Akut lenfoblastik lösemi tanısı 2016 Dünya Sağlık Örgütü (WHO, DSÖ) sınıflandırma kılavuzlarına dayanmaktadır (42) (Tablo 1). Bu kılavuzlar, hücre morfolojisi, immünofenotipler, genetik ve sitogenetik özelliklerin karakterizasyonunu içermektedir. Periferik kan ve kemik iliğinden alınan blast örneklerinin morfolojik tanısı mikroskopi ile yapılır. Ancak immünofenotipleme, hastalığın değerlendirilmesi için önemli olan kök hücreleri belirleme ve sınıflandırmaların tespiti için altın standarttır (1, 43).

Kromozom analizi, tanı sürecinin kritik bir bileşenidir. Geleneksel sitogenetik her hastada yapılmalıdır ve seçilmiş genomik anormalliklerin tespiti için floresan in situ

hibridizasyon (FISH) veya ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılmaktadır. Bu, özellikle geleneksel sitogenetikle tespit edilemeyen gizli translokasyonları tanımlamak için önemlidir (1, 2).

Tablo 1: Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ALL Sınıflaması

DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ ALL SINIFLAMASI (2016)
B hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma
B hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma, NOS
B hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma tekrarlayan genetik anomaliler olan
B hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
B hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma (v;11q23.3); KMT2A
B hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
B hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma hiperdiploidi ile olan
B hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma hipodiploidi ile olan
B hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH
B hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma (1;19)(q23;p13.3);TCF3-PBX1
Geliştirilebilir kriter: B hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma BCRL-1 mutasyonu benzeri
Geliştirilebilir kriter: B hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma iAMP21 birlikte
T hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfoma
Geliştirilebilir kriter: Doğal öldürücü hücreler (Natural Killer, NK) lenfoblastik lösemi/lenfoma

2.1.1.6 Tedavi

Akut lenfoblastik lösemi tedavi edilmezse ölümcül bir hastalıktır. ALL için tipik olarak tedavi 2-3 yıldır ve içinde dört aşamayı içerir: indüksiyon, konsolidasyon, intensifikasyon ve idame tedavileri. Allojenik hematopoetik hücre nakli, yüksek riskli hastalığı veya persistan minimal kalıntı hastalığı olan hastalar için konsolidasyon tedavisi sonrasında planlanır. Bu yoğun tedavi yaklaşımı, çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisinde tahmini 5 yıllık genel sağ kalımın %90'a ulaşmasına yol açmıştır (30). Bu oran 1970'lerde %34 iken 1990'lardan sonra %90 üzerindedir (44). Hastanın tanı yaşı, tanıda beyaz küre sayısı, tedaviye yanıt zamanı, sitogenetik ve moleküler anomaliler risk grubunu etkiler ve tedavi yoğunluğunu belirler (27, 28, 45). ALL'de ulusal ve uluslararası farklı kemoterapi

protokolleri yer almaktadır (29, 35). Bu protokollerde hedef tam remisyon sağlamaktır. Tüm protokellerde ilk aşama remisyonun sağlanması için indüksiyon aşamasıdır. İndüksiyon kemoterapisi, hastalık yükünü ortadan kaldırmayı ve tam remisyon elde etmek için normal hematopoezi geri kazanmayı amaçlar. İndüksiyon, genellikle bir glukokortikoid, antrasiklin, vinkristin ve L-asparaginaz içeren kemoterapi kombinasyonuna dayanır (28, 34). Güncel tedavi protokollerinin çoğunda indüksiyon tedavisinin ikinci basamağında sitozin-arabinozid (Ara-C), 6-merkaptopurin ve siklofosfamid de verilmektedir.

Konsolidasyon, tedavi düzeninin ikinci adımını oluşturur ve genellikle sitarabin, yüksek doz metotreksat (>500 mg/m2), vinkristin, asparaginaz, mercaptopurin ve glukokortikoidler içeren bir dizi kısa sıralı kemoterapi periyodunu içerir, bu periyodlar genellikle 2 haftada bir uygulanır ve hastanın bulunduğu risk grubuna göre toplamda 8 ila 12 hafta sürer (46) (BFM protokollerinde SR ve IR gruplarında 8 hafta, HR gruplarında 9 hafta). Bu sıralama, bir geç intensifikasyon evresi (yeniden indüksiyon tedavisi) ile devam eder ve bu evre, indüksiyon tedavisi sırasında kullanılana benzer bir ilaç kombinasyonunu içerir. ALL tanılı hastalarda relapsın önlenmesi için idame tedavi gereklidir. Bundan dolayı tüm hastalar uygulanan tedavi protokolüne göre 1,5-2 sene idame tedavisi alırlar. İdame tedavisinin içeriğini çoğunlukla günlük merkaptopürin ve aralıklı metotreksat tedavisi oluşturmaktadır (27, 29, 34).

Tedaviye verilen yanıt, uzun süredir akut lenfoblastik lösemi için bir prognostik faktör olarak kabul edilmektedir. Minimal rezidüal (kalıntı) hastalık (MRD), geleneksel analizle tam remisyon durumundaki hastalarda daha hassas yöntemlerle gösterilen hastalığın varlığıdır ve tedavi rejimlerine yanıtın prognostik etkisini değerlendirmek için standart bir ölçü haline gelmiştir. MRD değerlendirmesi, her tedavi aşamasının sonunda (yani, indüksiyon sonrası ve konsolidasyon sonrası) yapılır. Bu, düşük riskli hastalarda dahil olmak üzere tüm yaş gruplarında en güçlü prognostik faktördür. Yüksek risk grubunda kabul edilen hastalar tedavinin devamında kemik iliği transplantasyonuna yönlendirilir (29, 45, 47).

2.1.2 AKUT MYELOİD LÖSEMİ

Pediyatrik akut miyeloid lösemi çocukluk çağındaki tüm akut lösemilerin %15-20'sini temsil eder (48). Son birkaç yılda destekleyici bakımın iyileştirilmesi, risk sınıflandırmasının optimize edilmesi ve yoğunlaştırılmış kemoterapinin kullanılması nedeniyle sağ kalım oranları yaklaşık %70'e çıkmıştır (49). Çoğu çocukta AML de novo olarak ortaya çıkar, ancak az bir grup hastada ikincil bir malignite olabilir. Pediyatrik AML tanısı morfoloji, sitokimya, immünofenotip ve moleküler genetik kombinasyonunu içerir. Hastalığın prognozu genellikle tedaviye verilen ilk yanıta ve moleküler sitogenetik tanılara bağlıdır. Genel olarak, tüm pediyatrik AML hastalarının yaklaşık %30'u nüks eder ve hastaların %5-10'u ise hastalığın komplikasyonları veya tedavinin yan etkileri nedeniyle kaybedilir (48, 50).

2.1.2.1 Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Akut lösemilerin %15–20'si akut miyeloid lösemi (AML) olarak sınıflandırılır. AML'nin bebeklerde görülme sıklığı yılda 100,000 kişide 1.5'tir. Bu sıklık, 1–4 yaş arasında100,000 kişide 0.9'a ve 5–9 yaş grubunda 100,000 kişide 0.4'e düşer, en sık yetişkinlik döneminde görülür ve 65 yaş üstü bireylerde 100,000 kişide 16.2'ye ulaşır (51).

AML'nin temel nedeni bilinmemekte olup, çocukluk çağında AML genellikle de novo olarak ortaya çıkar. Yetişkin yaş grubunda AML genellikle miyelodisplastik sendrom (MDS) sonrasında görülür. Fanconi anemisi veya Bloom sendromu gibi genetik hastalıklar, AML geliştirme riskinde artış gösterir (52). Son zamanlarda, TP53, RUNX1, GATA2 ve CEBPA gibi gen mutasyonları, AML için yüksek riskli olarak bulunmuştur (48, 52).
Down sendromlu çocuklarda genellikle AML'nin megakaryoblastik bir alt tipi görülür. Bunun GATA1-2 genindeki somatik mutasyonlar nedeniyle olduğu bilinmektedir (53).

2.1.2.2 Tanı ve Sınıflandırma

AML, morfoloji, immunofenotipleme, genetik anormallikler, ayrıca klinik davranış açısından heterojen bir hastalıktır. AML'nin standart tanı süreci, kemik iliğinden veya periferik kandan elde edilen lösemik blast hücrelerinin morfoloji, immunofenotipleme, sitogenetik ve moleküler karakterizasyonunun bir kombinasyonuna dayanmaktadır (54). Her

AML hastası, klinik olarak ilgili bir alt grup içinde sınıflandırılabilir. Eskiden kullanılan morfolojiye dayalı French-American-British (FAB) sınıflandırması günümüzde, karyotip ve moleküler sapmaları da dikkate alan Dünya Sağlık Örgütü (WHO, DSÖ) sınıflandırması tarafından değiştirilmiştir. FAB sınıflamasında (Tablo 2) temel olarak baskın hücre tipine göre myeloid, myeloid-monositik, monositik, eritroid ve megakaryositik olmak üzere beş alt grup vardır (55). Myeloid hücre tipinde olgun hücre yüzdesine ve myeloblastın evresine göre dört alt grup vardır (AML M0, M1, M2 ve M3). Özellikle AML M0 ve AML M7 immunofenotiplemesi için FAB sınıflaması vazgeçilmezdir. DSÖ sınıflandırmasına göre (Tablo 3) AML üç ana alt grupta toplanmıştır (56): Tekrarlayan sitogenetik translokasyonlu AML'ler, çoklu displazi gösteren AML'ler ve sınıflandırılamayanlar(56). Sitoloji ve immunofenotipleme genellikle AML'yi ALL'den ayırt etmek için kullanılır (34, 48).
Çoğu kromozomal anormallik, geleneksel karyotiplemenin yanı sıra FISH veya RT-PCR ile tanımlanır. Bu tanı yöntemleri ilgili translokasyonları, füzyon genlerini veya kromozom materyali kaybını tespit eder (48, 54).

Tablo 2: FAB (French-American-British) AML Sınıflaması

FAB SINIFLAMASI

- M0: İmmatür myeloblastik (minimal diferansiye) lösemi
- M1: Az diferansiye (maturasyonun(olgunlaşma) olmadığı) AML
- M2: Matürasyonun olduğu AML
- M3: Promyelositik lösemi
- M4: Myelomonositik lösemi
- M5: Monositik lösemi
- M6: Eritrolösemi
- M7: Megakaryositik lösemi

Tablo 3: Dünya Sağlık Örgütü AML Sınıflaması

DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ AKUT MYELOİD LÖSEMİ SINIFLANDIRMASI

Tekrarlayan genetik bozuklukla birlikte olan AML	•t(8;21), (q22;q22), AML1-ETO füzyonu •Akut promyelositer lösemi: t (15;17)(q22q12) ve varyantları PML/RAR füzyonu •Anormal kemik iliği eozinofilisi olan AML: inv(16)(p13q22); t(16;16)(p13q22): CBFß-MYH1 füzyonu •11q23 MLL anomalileri AML inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
Çok seride displazi gösteren AML	•Öncesinde myelodisplastik sendrom var •Öncesinde myelodisplastik sendrom yok •Alkilleyici ajanlara bağlı •Epipodofilotoksine bağlı •Diğer
Sınıflandırılamayan grup	•Minimal diferansiye AML(M0) •Maturasyon (Olgunlaşma) göstermeyen AML • Maturasyon (Olgunlaşma) gösteren AML •Akut myelomonositik lösemi , •Akut monositik lösemi •Akut eritroid lösemi •Akut megakaryositik lösemi •Akut bazofilik lösemi •Myelofibrozla giden akut panmiyeloz

2.1.2.3 Tedavi

Pediyatrik AML'nin klinik sonuçları son birkaç yılda önemli ölçüde iyileşmiş olup, mevcut uzun vadeli sağ kalım oranları yaklaşık ~%70'tir (51). Bu iyileşme, kemoterapi rejimlerinin yoğunlaştırılması, risk gruplarına sınıflandırma, nüksetme durumunda daha iyi tedavi protokolleri ve destekleyici bakımın iyileştirilmesinden kaynaklanmaktadır (49, 54). AML risk grubu sınıflandırmasında, lösemik blast hücrelerinde bulunan (sitogenetik) anormallikler ve tedaviye erken yanıt değerlendirilir. Kemoterapi rejimleri, genellikle sitarabinin bir antrasiklinle birleştirilmesini içeren 4–5 döngü yoğun kemoterapiden oluşur (48, 49). Yoğun tedaviye rağmen, pediyatrik hastaların ~30'u nüks yaşar ve prognoz kötüdür (57). Bununla birlikte, tedavi ile ilgili ölümlerin yüksek olması (%5–10),(51) ayrıca antrasiklin kaynaklı kardiyomiyopati gibi uzun vadeli yan etkilerin görülmesi, kemoterapinin daha da yoğunlaştırılmasının artık mümkün olmadığını göstermektedir(57, 58).

Tedavinin esasını sitoredüksiyon ve remisyonun sağlanması oluşturur. AML'li çocukların tedavisi indüksiyon, konsolidasyon, intensifikasyon ve idame tedaviden oluşmaktadır. İndüksiyonda remisyon amaçlanarak en agresif tedavi verilir. Konsolidasyon ve intensifikasyon tedavileri remisyon sağlandıktan sonra uzun süreli hastalıksız sağkalım için önemlidir. İndüksiyon ve konsolidasyon tedavisi sonrası olgularda tam remisyon sağlanabilirse kemik iliği transplantasyonu değerlendirilir. Yüksek risk grubundaki hastalara, doku tipi tam uygun donör varlığında allojenik hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) uygulanması standart tedavi yaklaşımı olarak önerilmektedir. Uygun donör yoksa alternatif verici veya yoğun kemoterapi seçiminin merkezin kararına bırakılması önerilmektedir (48, 50, 54).

AML M3'te spesifik sitogenetik anomali olan t(15;17)'ye karşı hedefli tedavi olan olan all trans retinoik asit (ATRA) ve arsenik trioksit (ATO) kullanımı blastların farklılaşmasını sağlayarak hastalıksız sağ kalıma katkıda bulunmaktadır (49).

2.2 B12 VİTAMİNİ

B12 vitamini insanlar tarafından sentezlenemeyen kompleks bir koenzimdir. Literatür hâlâ B12 vitamini terimini kullanıyor olsa da, B12 vitamini için daha spesifik bir isim kobalamin'dir (59). Kobalamin, biyolojik fonksiyonları farklı dört bileşenden oluşur ve merkezi kobalt bölümüne sahip bir tetrapirolik korin halkasıdır. Siyanokobalamin ve hidroksokobalamin, kobalaminin sentetik formlarıdır (60). B12 Vitamini, B kompleks vitaminleri içinde en büyüğü olup moleküler ağırlığı 1000'in üzerindedir. Metilkobalamin ve adenozilkobalamin metabolik aktif formlarıdır.

Vücutta iki temel metabolik reaksiyonun kofaktörleridir;

1. Metilkobalamin, metiyonin sentaz enzimi ile katalizlenen, homosisteinden metiyonin biyosentezinde ve metil tetra hidro folatın (metil-THF) THF'ye dönüştürülmesinde koenzim olarak görev alır. Tetra hidro folat DNA sentezine yardımcı olur (Şekil 1).
2. Adenozilkobalamin, metilmalonil CoA mutaz enzimi ile, metilmalonil koenzim A'nın süksinil CoA'ya dönüşümde rol alır (Şekil 2).

Bu enzimatik reaksiyonlar ile oluşan ürünler ve yan ürünler DNA, RNA ve protein sentezi için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle kobalamin vücutta DNA sentezi, hematopoez ve myelinizasyon için şarttır.

2.2.1 B12 Vitamini Metabolizması ve Biyokimyası

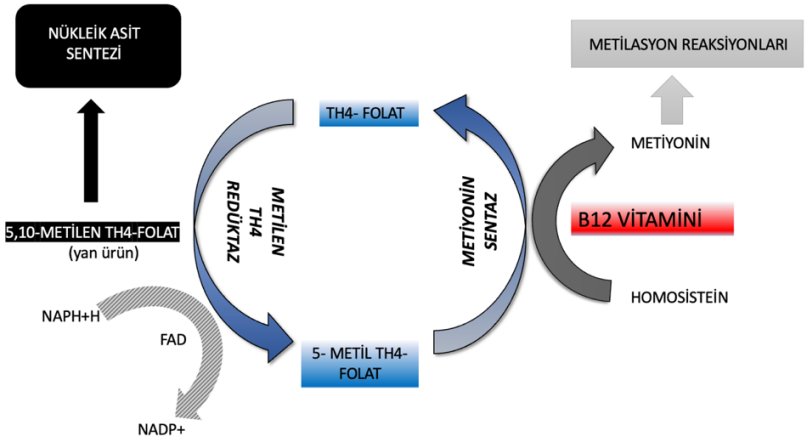
Kobalamin vücuda ağız yolundan veya parenteral yoldan alınabilir. Diyetteki kobalaminin ana kaynakları et, yumurta, süt ürünleri, balık, kümes hayvanı etleri ve deniz ürünleridir. Oral kobalamin formülasyonları, intrinsik faktör yardımıyla emilir. Kobalamin transportu ve hücrelere ulaşması intrensek faktör transkobalamin tarafından sağlanmaktadır. Sadece IF hücre reseptörleri ile etkileşime girerek kobalaminin düşük konsantrasyonlarda dahi hücresel kullanımını sağlayabilir. İntrinsik faktör yardımı olmadan, B12 vitamininin yaklaşık %1.2'si pasif bir şekilde emilebilir. Ağız yolundan alınan kobalamin sistemik dolaşıma terminal ileumdan alınır (61, 62).

Kobalamin parenteral olarak uygulandığında, bağırsak bariyerini atlar, diffüzyon yoluyla hızla emilir ve hızla sistemik dolaşıma girer. Sistemik dolaşımda, kobalamin

transcobalamin II (TCII) adı verilen bir taşıyıcı protein ile bağlanır ve transcobalamin II reseptörü olan dokuya girer. Kobalaminin yeni kan hücresi oluşumu ve nörolojik fonksiyon üzerinde büyük etkisi vardır (61).

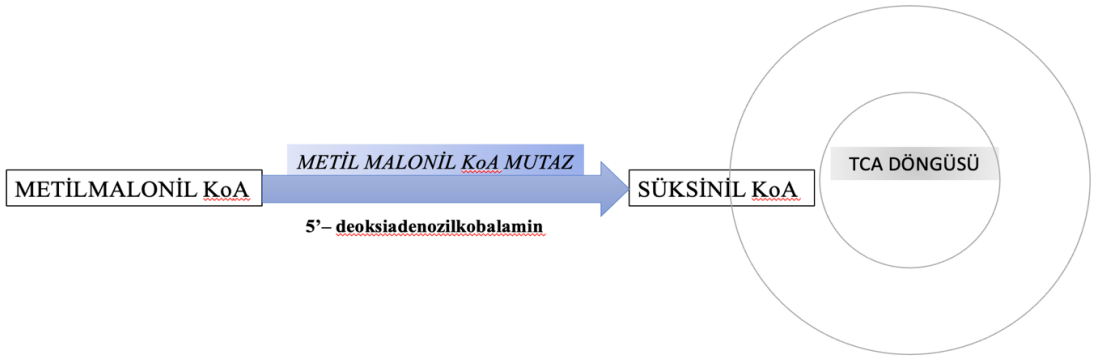
Hücresel düzeyde, kobalamin, metiyonin sentaz ve metil-malonil-co A mutaz adlı iki enzimatik reaksiyonun kofaktörü olarak hareket eder (13, 60). Bu enzimlerden biri olan metiyonin sentaz, vitaminin kobalta bağlı metil grubuna sahip kimyasal formunu kullanır. Bu form metilkobalamin olarak adlandırılır. Metiyonin sentaz, homosisteini metiyonine dönüştürmeye yardımcı olur (Şekil 1) ve kobalaminin yardımıyla, metil-THF, bu reaksiyonun bir yan ürünü olarak THF'ye dönüşür. Tetrahidrofolat (THF) tarafından alınan, serin amino asidi ve metil grubu, metilkobalamin yapmak üzere B12 vitaminine aktarılır. Metil kobalamin metil grubunu homosisteine aktarır ve metiyonin sentezlenir. Metiyonin daha sonra, metil grubunu diğer bileşiklere aktarmak üzere S–Adenozil Metyonin (SAM) haline çevrilir (63) (Şekil 1). Bu metilasyon reaksiyonu, fosfolipitlerin, nörotransmitterlerin ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi birçok molekülün sentezi için gereklidir.

Metiyonin sentaz reaksiyonunun yan ürünü olan THF tek karbonlu grupların yükseltgenmesi ve indirgenmesi tepkimelerine katılır (64). Bu tepkimeler ile serinden glisin sentezine, DNA sentezi için gereken timin bazının sentezine, hem DNA hem RNA sentezi için gereken pürin bazlarının sentezlerine ve metil gruplarının B12 vitaminine aktarılması olaylarına yarar (63). Timin ve pürin bazlarının sentezi, dolayısı ile hücre bölünmesi için THF gereklidir (64)(Şekil 1).



Şekil 1: Homosisteinin Metiyonine dönüşümünde Kobalaminin Rolü

L–metil malonil KoA'nın süksinil KoA'ya izomerizasyonu reaksiyonunda B12 vitamininin etkin koenzim biçimi 5'– deoksiadenozilkobalamindir. Bu tepkime, valin, izolösin, treonin, timin ve tek sayıda karbon içeren yağ asitlerinin son üç karbonundan gelen propiyonil KoA'yı Tri–Karboksilik Asit(TCA) döngüsünün ara ürünü olan süksinil KoA'ya çeviren metabolik yolun bir bölümünü oluşturur (64, 65)(Şekil 2). Dolayısıyla glukoneogenez olayında önem taşır. Bu reaksiyon, tek zincirli yağ asitlerinin ve dallı zincirli amino asitlerin oluşumuna yardımcı olur (65).



Şekil 2: Metil Malonil-KoA'nın Süksinil KoA'ya dönüşümü

2.2.2 B12 Vitamini Eksikliği

B12 Vitamini eksikliği genellikle B12 vitaminin besinlerle yetersiz alımı ve kötü emiliminden kaynaklanmakla birlikte, yaşlılarda, veganlarda veya yetersiz beslenen vejetaryenlerde yaygın olarak görülür. B12 vitamin eksikliği, günümüzde özellikle çocuklar ve üreme çağındaki kadınlarda sık görülen küresel boyutta bir sorun olarak kabul edilmektedir (66). Eksiklik sebepleri aynı zamanda yetersiz intrinsik faktör (IF) üretimi, atrofik gastrit, gastrik rezeksiyon, ilaç-besin etkileşimleri, çölyak, inflamatuar bağırsak hastalıkları gibi emilim bozan hastalıklar ve daha az yaygın genetik kusurlarla ilişkilendirilebilir (67).

Dünya'da ve Türkiye'nin değişik bölgelerinde yapılan çalışmalarda yüksek oranda B12 vitamini eksikliği saptanmaktadır (7, 9, 66, 68-70). Amerika'da toplumun genelinde yapılan kesitsel bir çalışmada (66) %8-9 oranında B12 vitamini eksikliği saptanmıştır. Çalışma ek

olarak 15 yaş altı grubunda B12 vitamini sıklığının %27 oranında olduğunu ve bu yüzden çocukların B12 vitamin eksikliği açısından riskli grup ele alınmasını vurgulamaktadır. Hindistan'da 12 ay altı çocuklarda yapılan bir çalışmada B12 vitamini eksikliği %63.7 olarak saptanmıştır (70). Türkiye'de Yetim A. ve ark. adölesan grubunda yaptığı çalışmada vakaların %35.6'sında B12 vitami düzeyi <200 ng/L altında saptanmıştır (69). Şanlıurfa bölgesinde yapılan bir çalışmada, B12 vitamini eksikliğinin gebelerde %72 ve bebeklerin kordon kanlarında %41 gibi yüksek bir oranda olduğu tespit edilmiştir (9). Elgörmüş ve ark. 6-72 ay grubunda İstanbul'da yaptığı çalışmada da (71) çocukların %31,6'nda B12 düzeyi < 200 ng/L, %25'nde B12 düzeyi 200-299 ng/L bulunmuştur.

B12 Vitamini eksikliği tedavi edilmezse megaloblastik anemi ve nörolojik komplikasyonlara yol açar. Eksiklik, B12 vitamin enjeksiyonları veya oral B12 vitamini ile tedavi edilir (67).

2.2.2.1 B12 Vitamini Eksikliğinde Klinik Bulgular

Kobalamin eksikliği olan çocuklarda pek çok nonspesifik klinik bulgu görülebilir. Uzun süren eksikliklerde nörolojik hasar bazen kalıcı olabilir. Ancak en sık bulgu megaloblastik anemidir. Trombositopeni ve/veya nötropeni ile ciddi makrositik anemi görülebilir (10, 72).

Kobalamin eksikliği, DNA sentezinde inhibisyona neden olduğundan megaloblastik değişiklikler yalnızca kemik iliğinde değil, hızlı bölünen diğer hücrelerde de görülmektedir. İnce barsak epitelinin etkilenmesi sonucunda malabsorbsiyon ve ishal görülebilir. Kobalamin eksikliğine bağlı belirgin nörolojik problemler görülür. Beyin büyüme ve gelişmesinin hızlı olduğu bebeklik döneminde bu bulgular birkaç hafta içerisinde dahi ortaya çıkabilir (73). En sık görülen nörolojik semptomlar büyüme geriliği, hipotoni, hiperirritabilite ile letarji, nöromotor gelişme geriliği, hareket bozuklukları, epilepsi, parestezi ya da nöropsikiyatrik değişikliklerdir. Büyüme geriliği, nutrisyonel kobalamin eksikliğinin en çarpıcı klinik bulgusudur (15). Hem içeren proteinlerin yetersiz sentezi, özellikle hemoglobin, ayrıca yetersiz süksinil-CoA üretimine bağlı olarak glukoneogenezin azalması büyüme geriliğine neden olmaktadır (73).

2.2.2.2 B12 Vitaminin Eksikliğinde Biyokimyasal Etkiler

Kobalamin eksikliğinin biyokimyasal sonuçları, kobalamin bağımlı enzimler olan metiyonin sentaz ve metilmalonil CoA mutazın aktivitelerinin azalmasına bağlı olarak ortaya çıkar. Metiyonin sentazın aktivitesinin azalması, homosisteinin seviyesinin kanda ve idrarda artması ile sonuçlanır. Metilmalonil CoA mutaz enzim aktivitesinin aksaması da kanda ve idrarda MMA birikimi ile sonuçlanır (60).

Metiyonin insanlarda esansiyel bir aminoasittir. Metiyonin sentaz hücresel metabolizma sonucu metiyoninden oluşan homosisteini tekrar remetile ederek metiyonin seviyesini korurken homosistein birikimini de önler. Metiyonin aktive olarak birçok önemli molekülün metilasyonundan sorumlu olan S-adenozilmetiyonin (SAM)'a dönüşür. Bu önemli metilasyon reaksiyonlarından bazıları gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan DNA metilasyonu, RNA metilasyonu, lipidler, histonlar da dahil proteinler, nörotransmitterler ve tiyollerdir (17). Ek olarak metiyonin sentaz reaksiyonunda yan ürün olarak oluşan THF oluşamaması sonucunda serinden glisin sentez edilmesi, DNA sentezi için gereken timin bazının oluşumu ve hem DNA hem RNA sentezi için gereken pürin bazlarının yapımı bozulur. Timin ve pürin bazlarının sentezi, dolayısı ile hücre bölünmesinin devamı için B12 vitamini gereklidir (64).

2.2.3 B12 Vitamini Tedavisi

Yaşa göre B12 vitamin ihtiyacının farklılık gösterdiği bilinmekle birlikte büyük çocuklarda 0,9-2,4 μg /gün'dür (74). Tedavisinde klinik olarak farklı yaklaşımlar olsa da yerine koyma tedavisi şeklindedir. Hafif, asemptomatik eksiklikte, diyetin değiştirilmesi veya altta yatan bir durumun düzeltilmesi uygun olabilir, ancak çoğu durumda B12 vitamini verilmesi gerekir. Kobalamin, hastaların durumuna, sunumuna ve taleplerine bağlı olarak oral veya intramusküler olarak uygulanabilir. Şiddetli kobalamin eksikliği olan bir hastaya başlangıçta intramusküler yoldan tedavi uygulanır. Eğer eksiklik daha hafifse, o zaman oral formülasyon da B12 seviyesini yeniden doldurmada yardımcı olabilir. İntramusküler kobalamin, siyanokobalamin ve hidroksokobalamin olmak üzere iki formda bulunur. Siyanokobalamin, metabolik olarak aktif kobalamine dönüştürülmesi gereken bir formdur ve bu form Amerika Birleşik Devletleri'nde mevcuttur, oysa hidroksokobalamin, Avrupa'nın bazı bölgelerinde tercih edilen bir ajandır. Sublingual veya nazal yollar daha pahalıdır fakat çocuklarda

uygulama kolaylığı nedeniyle tercih edilebilir. Tedaviler karşılaştırıldığında tedavi için birbirlerine benzer olarak bulunmuşlardır (62, 75).

Tablo 4: FDA onaylı B12 Vitamini Tedavi Endikasyonları:

FDA onaylı tedavi endikasyonları:
Pernisyöz anemi: Mide parietal hücrelere karşı oluşan otoantikorlara bağlı intrinsik faktör eksikliği sonucunda vitamin B12'nin ileum aracılığıyla emiliminin azalmasına neden olur.
Malabsorpsiyon
Atrofik gastrit: İntrinsik faktör seviyesi azalır ve vitamin B12'nin emiliminde azalmaya neden olur.
Kronik asit azaltıcı ilaç kullanımı: Kronik asit salgısının azalması, besin partiküllerinin proteininden bağlanmış vitamin B12'nin salınımını azaltır, bu nedenle R faktörü bağlanamaz ve sonuç olarak vitamin B12 emilimi azalır.
Total veya parsiyel gastrektomi
Diphyllobothrium latum enfeksiyonu
Pankreas yetersizliği
Helicobacter pylori enfeksiyonu
Vitamin B12 eksikliği (biyokimyasal olarak kanıtlanmış düşüklük)

Eğer bir kobalamin eksikliği, sıkı bir vegan diyetinden kaynaklanıyorsa, bu durumda oral formülasyon yeterlidir. Eğer bir hastaya pernisiyöz anemi, İF eksikliği, İmmerslund Grasbeck sendromu, TC2 eksikliği teşhisi konulursa veya terminal ileum cerrahi çıkarılırsa tedavi ömür boyu devam etmelidir. Bunlar dışında başka nedenler varsa, tedavi hematolojik göstergeler düzelene kadar devam etmelidir (67) (Tablo 4).

2.2.4 B12 Vitamini ve Kanser İlişkisi

DNA'nın sentezi ve onarımı, B12 vitaminin ve folik asidin iyi bilinen fonksiyonlarıdır. Ames ve ark. (76), folat eksikliğinin ve B12 vitamini eksikliğinin metilasyon reaskiyonunda görevli olması nedeniyle, insan DNA'sında kromozomal kırıklar aracılığıyla kanserle ilişkili olduğunu belirtmektedir. Minnet ve ark. çalışmasında (17) B12 vitamini eksikliği olan hastalarda mononükleer hücrelerde DNA hasarının arttığı ve B12 vitamini tedavisi uygulandıktan sonra DNA hasar skorlarında belirgin bir iyileşme olduğu, ancak tedavi sonrasında bile kontrol grubundakilere göre hala belirgin bir şekilde yüksek kaldığı görülmüştür.

2.3 D VİTAMİNİ

D vitamini dört halkalı bir kolesterol omurgasına sahip yağda çözünen bir vitamindir. Yapısal olarak hormonlara özellikle steroidlere benzer. Vitaminler, spesifik enzimatik reaksiyonlarda kofaktör olarak görev alan ve vücutta sentez edilemeyen organik bileşenlerdir (77). D vitamini için bu durum farklıdır, D vitamini cilt epitel hücrelerinde sentezlenebilir. Bundan dolayı teknik olarak bir vitamin değildir (11). D vitaminin ciltte sentezi en önemli kaynaktır; çünkü doğal besin kaynaklarında günlük yeterli ihtiyacı karşılayacak bir vitamin D2 kaynağı yoktur. Somon, ringa, sardalya gibi yağlı balıkların karaciğerinde bol miktarda ve eser miktarda yumurta sarısında peynirde, mantarda bulunur (11, 78). Anne sütü de D vitamini açısından fakirdir. 1 litre anne sütü yaklaşık 12-60 IU D vitamini içerir (79). Çocuklar için günlük ihtiyacın 400 IU/Gün olduğu düşünülürse bu düzey oldukça düşüktür.

2.3.1 D Vitamini Fizyolojisi

D vitamini, vücuttaki kalsiyum homeostazını düzenlemek açısından hayati bir öneme sahiptir. Kalsiyum bir mineral olarak; kemik sağlığı, kas fonksiyonu ve sinir iletimi gibi fizyolojik süreçler için esastır. D vitamini, kalsiyum emilimini ve metabolizmasını düzenleyen aktif bir hormon haline gelmesi için bir dizi metabolik süreçten geçer (11, 79).

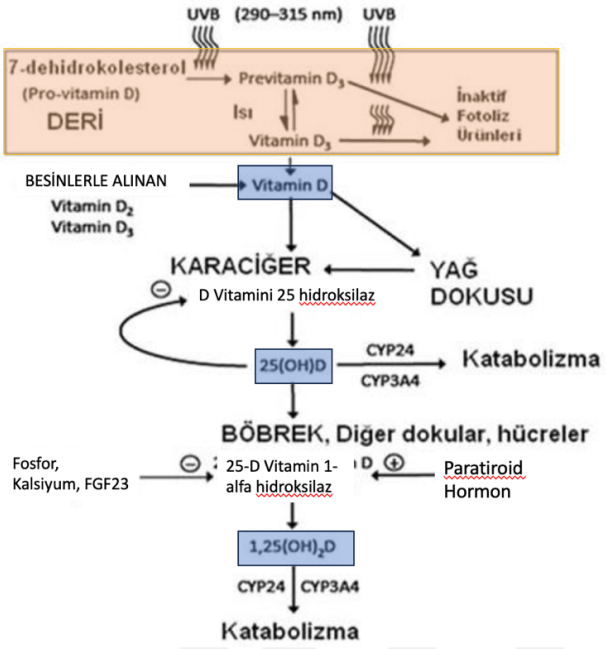
Diyetteki D vitaminin (Ergokalsiferol) büyük çoğunluğu ince bağırsaktan emilir, bu emilim için safra oldukça önemlidir. İnflamatuar bağırsak hastalıkları, çölyak hastalığı, kistik fibroz, pankreas yetmezliği ve kolestatik karaciğer hastalığı gibi emilim bozukluklarında diyetle alınan D vitamini emilimi bozulur (80). Bu hastalıklar sıklıkla düşük D vitamini düzeyleriyle birliktedir. Emilen D vitamini lenfatik sistemde şilomikronlara katılarak sistemik dolaşıma geçer.

Cilt epitelinde previtamin D3, güneş ışığına yani ultraviyole B'ye (UV-B) maruz kalma esnasında deride 7- dehidrokolesterolden (provitamin D3) sentezlenir (Şekil 3). Previtamin D3 daha sonra bir yeniden düzenleme ile 3-kolekalsiferol'e dönüşür (78).

Sistemik dolaşımda D vitamini, D vitamini bağlayıcı proteinler (DBP) ile taşınır. DPB'ler ile hepatosite taşınan D3 vitamini, 25-hidroksilaz enzimi ile 25 hidroksi vitamin D'ye (25(OH)D) dönüşür. Bu sistemik dolaşımda en çok bulunan D vitamini formudur. Standart durumlarda hastaların D vitamini durumunu değerlendirmek için biyokimyasal olarak bakılan D vitamini formu da budur (78).

Son aşama böbreklerde gerçekleşir (Şekil 3). Böbreklerde bulunan 1-alfa hidroksilaz enzimi 25-OH D vitaminine ikinci bir hidroksi (OH) grubu ekleyerek 1,25-dihidroksi Vitamin D (1-25$(OH)_2$D) oluşmasını sağlar. 1-alfa hidroksilaz enziminin kontrolü Paratiroid hormon (PTH) tarafından yapılır. 1-25$(OH)_2$D artması PTH aktivitesinin baskılar (78, 80). 1-25$(OH)_2$D vitamini çoğunlukla DBP ile taşınır. Hücre içi Vitamin D reseptörlerine (VDR) bağlanarak gen ekspresyonlarını aktive eder. VDR, insan vücudunda neredeyse tüm çekirdekli hücrelerde bulunur (81). Bu bağlanmanın en bilinen etkileri; bağırsaklarda kalsiyum emilimini artırır, kemik yapımını uyarır, paratiroid beze bağlanarak da PTH salgısını azaltır (11) (Şekil 3).

D vitamini, VDR'nin yapısı ve etki mekanizması, vücutta sentez edilmesi, sentez edildiği yerden uzakta etki göstermesi ve feedback kontrolünün olması nedeniyle, vitamin olmaktan çok bir steroid hormon gibi davranmaktadır (81). D Vitamini, hücre genomunda gen transkripsiyonunu regüle ederek asıl etkisini gösterir. Hücre genomunda etkilediği bölgenin oldukça büyük (82) olması en çok bilinen etkileri yanı sıra antineoplastik, immunmodulatör gibi diğer geniş etkilerini de açıklar (82).



Şekil 3: D Vitamini sentezi

2.3.2 D Vitamini Eksikliği

2.3.2.1 D Vitamini Eksikliği Tanımı

D Vitamini durumunu en iyi gösteren kan parametresi, serum 25(OH) D vitamini düzeyidir (78) çünkü D vitamininin dolaşımdaki ana formudur ve 2-3 haftalık bir yarı ömre sahiptir. Buna karşılık, aktif form olan 1-25$(OH)_2$ D vitamini yaklaşık 4 saatlik, çok daha kısa bir yarı ömre sahiptir. Ayrıca 1-25$(OH)_2$ D vitamininin kan düzeyi paratiroid hormona karşı çok hassastır (80). Serum 25(OH) D vitamini düzeyi hem oral alınan D2 hem de UVB etkisiyle ciltten sentezlenen D3 türevlerinin toplam sonucunu ölçer (81).

D vitamini için yetersizlik ve eksiklik tanımlamalarında kullanılan sınırlar yaklaşık değerlerdir. Eksiklik ve yetersizlik tanımlamaları senelerdir yapılan çalışmalarla oluşturulmuştur (80). En güncel meta analizlerde ve Avrupa Pediatrik Endokrinoloji Topluluğu (ESPE) önerilerinde(83) D vitamini eksikliği ve yetersizliği belirten serum 25-hidroksi vitamin D konsantrasyonu aralıkları şu şekildedir:[<12 ng/mL (<30 nmol/L)] D vitamini eksikliği, [12-20 ng/mL (30-50 nmol/L)] D vitamini yetersizliği ve [>20 ng/mL (>50 nmol/L)] optimal değer (78, 80, 83).

2.3.2.2 D Vitamini Eksikliği Sıklığı

D Vitamini eksikliği tüm dünyada yaygın olarak görülür. Amerika Birleşik Devletleri'nde, çocuklarda D vitamini eksikliğinin genel prevalansı ırk ve risk faktörlerindeki farklılıklar nedeniyle alt popülasyonlar arasında yaklaşık %15-25 aralığında değişmektedir(84).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda daha yüksek oranlarda eksiklik saptanmıştır. Alpdemir ve ark.'nın 2019 yılındaki metaanalizinde, genel popülasyonda vitamin D eksikliği prevalansı %63 bulunmuştur. Bu oran yenidoğanlarda %86,6, çocuklarda %39.8 ve yetişkinlerde %63.5 olarak bildirilmiştir(85). Akman ve ark.'nın Ankara'da 2011 yılında yaptığı çalışmada çocuklarda eksiklik %8, yetersizlik %25.5 bulunmuştur(86). Hocaoğlu ve ark.'nın 2019'da anaokuluna giden çocuklarda yaptıkları araştırmada D vitamini yetersizliği %18.6, eksikliği %6 olarak saptanmıştır(6).

2.3.2.3 D Vitamini Eksikliğinde Klinik Bulgular

D vitamini eksikliği olan hastaların çoğu asemptomatiktir (87). Semptomatik D vitamini eksikliği sıklıkla bebeklerde ve küçük çocuklarda iskelet sistemi değişiklikleri şeklinde görülür. D Vitamini eksikliğinin ilk sonucu olarak bağırsakta kalsiyum (Ca) emilimi azalır. Eksikliğin şiddeti ve süresi uzadıkça Ca ve Fosfor (P) düzeyindeki azalmaya yanıt olarak Paratiroid hormon düzeyi kanda artar (78). PTH kemikte osteoklastik aktiviteyi arttırarak kemiklerde mineralizasyonu bozar; rikets (raşitizm) veya osteomalazi gelişimine neden olur (78, 88).

Rikets, (89) büyüyen kemik ve kıkırdak mineralizasyonunun yetersizliğidir ve küçük çocuklarda D vitamini eksikliğinin başlıca sonucudur. Asemptomatik olabileceği gibi kemik ağrısı, büyüme geriliği, fontanellerin geç kapanması, geniş fontaneller, raşitik rozari, el bilek ve ayak bileklerinde genişleme görülebilir (89). Osteomalazi, epifiz plakları kapandığından daha çok adölesan ve yetişkinlerde görülür. Asemptomatik olabilir veya yaygın kas ve kemik ağrısı olarak da kendini gösterebilir (78, 88). D Vitamini eksikliğinin diğer klinik bulguları ise sıklıkla Ca ve P eksikliğine bağlı kas güçsüzlüğü, tetani, bebeklerde apne nöbetleri, stridor veya hipotoni şeklinde görülebilir (78, 87).

2.3.3 D Vitamini Tedavisi

D Vitamini düzeyi 20 ng/ml altında ise tedavi başlanması gereklidir (78, 90, 91). D vitamini eksikliğine bağlı osteomalazi veya rickets hastalığı olmaması tedavi başlanmasına engel

değildir. Genel olarak tedavide vitamin D_2 (ergokalsiferol) veya D_3 (kolekalsiferol) içeren preparatlar kullanılabilir ama vitamin D_3 uzun yarı ömrü nedeniyle tedavide daha çok tercih edilir (78).

Vitamin D eksikliği ve vitamin D eksikliğine bağlı nütrisyonel rikestin yaşa göre tedavisinde sıklıkla kullanılan Amerikan Pediatri Akademisi "D vitamini ve kalsiyumun diyetle alımı ve desteği rehberine göre" (90, 91); 0-12 ay bebeklerde 6-12 hafta, günde 2000 IU önerilir ardından idame olarak, günlük en az 400 IU olarak devam edilmelidir (90). 1-18 yaş arası çocuklarda 6-12 hafta, günde 2000 IU verilmelidir ardından idame olarak, günlük en az 600 IU vitamin D devam edilmelidir (90). Adölesan yaş grubu için, haftada bir kez 50.000 IU 6 hafta vitamin D verilerek ardından idame olarak 600 IU/gün devam edilebilir (81). Kısa süreli yüksek doz D vitamini tedavisi "stoss" tedavisi olarak bilinir. Bu tedavi rejimi hiperkalsemi riski açısından çocuklarda tercih edilmemelidir, günlük tedavi rejimi daha güvenlidir (78, 81, 91).

2.3.4 D Vitamini ve Kanser İlişkisi

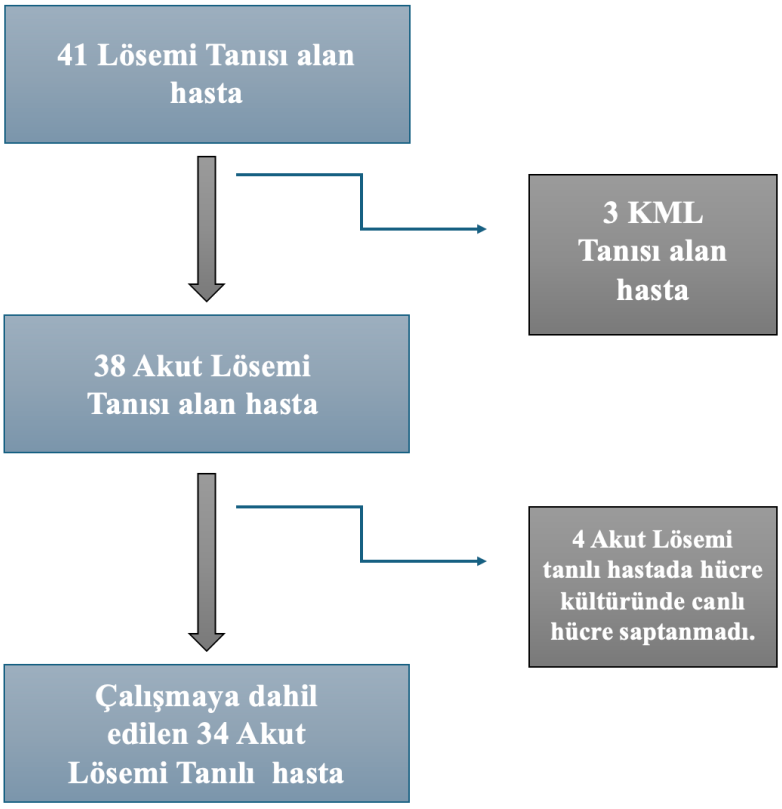
D vitaminin, VDR üzerinden kanserin patogenezinde ve ilerlemesinde rol oynayabileceği gösterilmiştir. D Vitamininin antiproliferatif etkisi, programlanmış hücre ölümünün indüksiyonu, invazyon, metastaz ve anjiogenezisin inhibisyonu gibi etkileri nedeniyle eksikliğinde kanser insidansinda artış ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Hangi D vitamini düzeyi altında bu etkilerinin azaldığı ya da kanser insidansını azaltmak için gereken D vitamini düzeyi net bilinmemekle birlikte 20 ng/ml nin üzerinde tutulması gerektiği vurgulanmıştır (92). D Vitamini eksikliği yanı sıra, VDR genindeki polimorfizmler de kanser riski ile ilişkilendirilmiştir (25). CYP27B1, birçok kanser hücresi ve dokusunda yüksek düzeyde ifade edilmekte olup, $1,25(OH)_2$ D'nin öncelikle miyelom ve melanom hücreleri üzerinde, daha sonra da diğer kanserli hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkisi olduğu kanıtlanmıştır (81). Farklı hayvan modellerinde yapılan birkaç çalışmada, D vitamini analogları kanser ilerlemesini ve metastaz gelişimini yavaşlatmıştır (92). D Vitamini ve kanser arasındaki klinik veriler tartışmalıdır: düşük vitamin D seviyeleri, kanser riski ile ilişkilendirilmiş olsa da, randomize kontrollü çalışmalar D vitamini takviyesinin faydasını gösterememiştir. Ancak uluslararası çok merkezli randomize kontrollü çalışmalar, özellikle D vitamininin immünolojik ve onkolojik etkileri için tasarlanmıştır (93).

3.HASTA VE YÖNTEM

Araştırma, deneysel bir çalışmadır. 0-18 yaş grubunda akut lösemi düşünülen hastalarda kesin tanı için kemik iliği aspirasyonu yapılmaktadır. Kemik iliği aspirasyonu sonucunda akım sitometriye ve patolojiye gönderilen örneklerle akut lösemi tanısı kesinleşmekte ve tiplendirilmektedir.

3.1 Hasta Seçimi

Haziran 2022 ve Aralık 2023 tarihleri arasında, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bilim Dalına ateş, yorgunluk, kilo kaybı benzeri semptomlar ile başvuran, yapılan tetkiklerde (tam kan sayımı, periferik yayma, serum biyokimya, kemik iliği aspirasyonu) kemik iliği infiltrasyon bulguları saptanan ve cam yaymasında görülen şüpheli lenfoid blastlar ile akut lösemi tanısı düşünülen, bilinen başka bir ek hastalığı olmayan 0–18 yaş arası 38 hasta saptanmıştır. Bu hastalardan 34 tanesi çalışmaya dahil edilmiştir. 4 hasta yapılan analizler sonucunda hücre kültüründe canlı hücre saptanmaması nedeniyle çalışmaya dahil edilememiştir. (Şekil-4)



Şekil 4: Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Seçim Diyagramı

3.1.1 Çalışmaya dahil edilme kriterleri

1. Akut Lösemi (AL) tanısı almış olmak
2. 0–18 yaş arasında olmak
3. Akut Lösemi yanında kan tablosunu etkileyebilecek bilinen ek başka bir hastalığı bulunmamak

3.1.2 Çalışmadan dışlanma kriterleri

1. 18 yaşından büyük olmak
2. Akut Lösemi yanında kan tablosunu etkileyebilecek bilinen ek başka bir hastalığı bulunmak
3. Hücre kültüründe canlı hücre bulunmamak

Hastalardan tanı için alınan kemik iliği kaynaklı blast hücreleri araştırma için kullanılmıştır. Çalışmada, hastaların akut lösemi tanısı için yapılan kemik iliği aspirasyonundan elde edilen blast hücreleri çalışma için -80 ^{0}C de saklanmıştır. Dondurulan blastlar beş deney grubu kapsamında beş farklı besiyeri ile proliferasyon ve canlılık analizleri için kültür edilmiştir. Birinci grup besiyerine hiçbir şey eklenmemiş (Kontrol grubu- B12 vitamini ve D vitamini eklenmeyen), ikinci gruba B12 vitamini 200 ng/L konsantrasyonunda, üçüncü gruba 400 ng/L konsantrasyonunda eklenmiş, dördüncü gruba 20 µg/L konsantrasyonunda D vitamini ve beşinci gruba 40 µg/L konstantrasyonunda D vitamini eklenmiştir. Bahsedilen besiyerlerinde blast hücreleri beş gün (120 saat) 37°C derecede inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinin ardında akım sitometri cihazı ile proliferasyon ve canlılık analizi yapılmıştır.

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 Kemik iliği aspirasyonundan blast hücrelerinin izolasyonu

Kemik iliği aspirasyonu ile alınan 2 cc kemik iliği örneği 1/1 (v/v) oranında steril fosfat tampon solüsyonuyla [PBS (phosphate buffered saline) (Pan-Biotech, cat no: P04-35500)] sulandırılmış ve 1 ml fikol (Merck, F4375) yoğunluk ayrıştırıcı solüsyon üzerine 45 derecelik açıyla yayılmıştır. 2000 rpm devirde 20 dk santrifüj edildikten sonra ortada kalan "buffy coat" toplanmıştır. 15 ml steril flakon tüpe aktarılan mononükleer hücreler aynı hacimde PBS ile dilüe edilerek 1500 rpm devirde 5 dk santrifüj edilmiştir.

Dipte kalan hücre pelleti 0,5-1 ml cRPMI 1640 [(Gibco, cat no: 12633012), %10 FBS (Pan-Biotech, cat no: P30-3033), %1 penisilin/streptomisin (Pan Biotech, cat no: P06-07100)] besiyeri içinde süspanse edilmiştir. Ardından izole edilen blast hücreleri CD34 microbead (Miltenyi Biotech, cat no: 130-046-702) ile kit yönetmeliğine göre işaretlenmiş ve AutoMACS Cell Sorting cihazında pozitif seleksiyon ile CD34 + hücreler hücre süspansiyonundan elimine edilmiştir.

3.2.2 Deney gruplarının oluşturulması ve ko-kültür deneyleriyle analizleri

Aşağıda belirtildiği şekilde 5 grup besiyeri oluşturulmuştur;
G1: Kontrol grubu- B12 vitamini ve D vitamini eklenmeyen
G2: B12 ile Desteklenen (200 ng/L konsantrasyonunda)
G3: B12 ile Desteklenen (400 ng/L konsantrasyonunda)
G4: D vitamini ile Desteklenen (20 µg/L konsantrasyonunda)
G5: D vitamini ile Desteklenen (40 µg/L konsantrasyonunda)

Ko-kültür yapıldığında ayrılan lösemi blast hücreleri 48 kuyucuklu kültür kabına her kuyuda 500.000 blast hücresi olacak şekilde kültür edilmiştir. G2, G3 besiyerlerine belirtilen konsantrasyonlarda B12 vitamini ve G4, G5 besi yerlerine de belirtilen konsantrasyonlarda D vitamini eklenmiştir. Hazırlanan kültür sistemi 37°C, %5 CO2'li etüv içerisinde, 120 saat (5 gün) boyunca inkübe edilmiştir. 120 saat sonrasında blast hücreleri proliferasyon ve canlılık analizleri için boyama işlemlerine geçirilmiş ve ardından akım sitometri okumaları yapılmıştır.

3.2.3 Annexin V ve PI (Propidium Iodide) ile Apoptoz Analizi

Kültürün beşinci gün sonunda blastlardaki apoptoz analizinin yapılması için kuyucuklara kitin protokolüne uygun olacak şekilde Annexin V FITC (Floresein İzotiyosinat) (Elabscience, E-CK-A211) ve PI ile işaretleme/boyanma gerçekleştirilmiştir. Ardından akım sitometri cihazında hücreler okutularak canlı hücre, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücrelerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin Annexin V ve PI boyama desenlerine göre apoptozun farklı aşamalarındaki hücre yüzdeleri elde edilmiştir.

Canlı hücreler, Annexin V ve PI ile minimal boyama göstermiştir. Erken apoptotik hücreler, PI ile boyanma göstermemiş olup Annexin V ile boyanma göstermiştir. Geç

apoptotik hücreler hem Annexin V hem de PI boyanması göstermiştir.

3.2.4 CFSE Boyama ile Proliferasyon Analizi

CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) (Thermofisher, cat no: C34554) içerisine 18 uL DMSO (dimetil sulfoksit) eklenerek karıştırılmış ve stok solüsyon olarak hazırlanmıştır. 1 uL stoktan alınmış ve kültüre alınacak blast hücrelerinden 1 ml PBS içerisinde $1x10^6$ hücre olacak şekilde ko-kültürün gerçekleştirildiği gün proliferasyon için ayrılacak olan kuyucuklarda kit protokolüne uygun olacak şekilde CFSE işaretleme gerçekleştirilmiştir. Kültürün, beşinci gün sonunda akım sitometri cihazında okutma gerçekleştirilmiştir.

3.3 İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin kaydedilmesi ve istatistik analizler için IBM® SPSS® Statistics (Statistical Package for Social Sciences) 27.0 programı kullanılmıştır. Çalışmada tanımlayıcı istatistikler için ortalama, standart sapma, en düşük (minimum) ve en yüksek (maksimum) değer, sayı (n) ve yüzdeler (%) kullanılmıştır.

Sürekli nicel verilerin normal dağılıma uygunluğu Tek Örnek Kolmogorov Smirnov testi ile analiz edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda normal dağılıma uygunluk bulunamadığı için ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Araştırmaya dahil edilen hastaların tanı aşamasındaki B12 vitamini değerleri ve D Vitamini değerleri ile deney gruplarında ölçülen blast hücre yanıtları arasındaki bağıntı (proliferasyon, canlı hücre, ölü hücre, erken ve geç apopitozis) Spearman Korelasyon Analizi ile test edilip, anlamlı korelasyon bulunamadığı ve başlangıç B12 vitamini ve D Vitamini değerleri düşük ve normal olan hasta grupları blast hücrelerinin yanıtları (proliferasyon, canlı hücre, ölü hücre, erken ve geç apopitozis) açısından Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadığı ve dağılım non parametrik olduğu için tekrarlayan ölçümlerdeki karşılaştırmalarda Friedman testi kullanılmıştır. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya Marmara Üniversitesi EAH Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniği'ne ateş, halsizlik, solukluk, çabuk yorulma, kanama, deride döküntüler, eklem ve kemiklerde ağrı vb şikayetler ile başvuran ve akut lösemi tanısı alan 34 hasta alınmıştır. 34 hastanın 30'u (%88,2) ALL, 4'ü (%11,8) AML tanısı almıştır (Tablo 5). Hastaların 18'i (%52,9) kız, 16'sı (%47,1) erkektir ve yaş ortalaması 95,15±59,65 ay (min: 12,0 ay – max: 207,0 ay)'dır (Tablo 5).

Tablo 5: Hastaların Yaş, Cinsiyet ve Akut Lösemi Tanılarının Dağılımı

Özellik	**Sayı (%)**
Yaş (ay)	95,15±59,65 ay (min: 12,0 ay – max: 207,0 ay)
Cinsiyet	
Kız	18 (%52,9)
Erkek	16 (%47,1)
Tanı	
ALL	30 (%88,2)
AML	4 (%11,8)

- ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi, AML: Akut Myeloid Lösemi

Çalışmaya dahil edilen hastalardan 21'inin (% 61,8) B12 Vitamini değerleri tanı anında normal iken (>200ng/L), 13'ünde (%38,2) eksiklik tespit edilmiştir. (Tablo 6).

Tablo 6: Tanı Aşamasında Hastaların B 12 Vitamini Eksiklik Durumları

Tanı	**B12 Vitamini**		**Toplam**
	Düşük n (%)	Normal n (%)	
ALL	12 (%40,0)	18 (%60,0)	30
AML	1 (%25,0)	3 (%75,0)	4
Toplam	13 (%38,2)	21 (%61,8)	34

- Satır yüzdesi verilmiştir.
- ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi, AML: Akut Myeloid Lösemi

Tanı anında 5 hastanın (%14,7) D Vitamini düzeyleri normal değerlerde (>20 ng/mL), 17 hastanın (%50,0) D Vitamini düzeyleri yetersiz (12-20 ng/mL), 12 hastanın (%35,3) D Vitamini düzeyleri düşük olarak (<12 ng/mL) olarak saptanmıştır. (Tablo 7).

Tablo 7: Tanı Aşamasında Hastaların D Vitamini Eksiklik Durumları

Tanı	**D Vitamini**			**Toplam**
	Düşük n (%)	Yetersiz n (%)	Normal n (%)	
ALL	10 (% 33,3)	15 (% 50,0)	5 (% 16,7)	30
AML	2 (% 50,0)	2 (% 50,0)	0 (% 0)	4
Toplam	12 (% 35,3)	17 (% 50,0)	5 (% 14,7)	34

- Satır yüzdesi verilmiştir.
- ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi, AML: Akut Myeloid Lösemi

Çalışmaya dahil olan hastaların 21'inin (% 61,8) tanı aşamasında folik asit düzeyleri normal sınırlarda (>3.8 mcg/L) iken, 13'ünün düzeyleri (%38,2) düşük (<3.8 mcg/L) bulunmuştur (Tablo 8).

Tablo 8: Tanı Aşamasında Hastaların Folik Asit Eksiklik Durumları

Tanı	**Folik Asit**		**Toplam**
	Düşük n (%)	Normal n (%)	
ALL	12 (% 40,0)	18 (% 60,0)	30
AML	1 (% 25,0)	3 (% 75,0)	4
Toplam	13 (% 38,2)	21 (% 61,8)	34

- Satır yüzdesi verilmiştir.
- ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi, AML: Akut Myeloid Lösemi

Araştırmaya dahil edilen hastaların kan sayımı (hemogram) bulguları Tablo 9'da verilmiştir. Hastaların tamamında hemoglobin değerleri düşük, lökosit sayıları ise yüksek olarak saptanmıştır. Beklendiği biçimde AML hastalarında lökosit ve lenfosit sayıları daha düşükken, nötrofil sayılarının daha yüksek olduğu görülmüştür. ALL ve AML gruplarında ortalama trombosit değerleri trombositopeni ile uyumludur.

Tablo 9: Tanı Aşamasında Hastaların Kan Sayımı Bulguları Ortalama Değerleri

	ALL (n=30)	AML (n=4)
WBC (/µL)	36103,33±45200,02	18425,00±26062,40
NEU (/µL)	2093,3±2684,6	8025,0±13897,0
LYMPH (/µL)	26116,67±37561,54	3100,00±3925,98
PLT (/µL)	90266,67±114936,25	82250,00±110052,65
HGB (g/dL)	7,7±2,8	7,8±0,97

- WBC: White Blood Cell (lökosit), NEU: Nötrofil, LYMPH: lenfosit, PLT: platelet (trombosit), HGB: hemoglobin

Hastaların tanı aşamasında bazı biyokimyasal parametrelerine ilişkin değerler Tablo 10'da özetlenmiştir. Ortalama B12 vitamini değerleri AML hastalarında daha yüksek saptanmıştır, Ortalama D vitamini değerleri her iki grupta da benzer olarak (12-20 ng/mL aralığında [yetersiz düzey]) saptanmıştır. Ortalama potasyum, fosfor, kalsiyum ve ürik asit değerleri tüm gruplarda normal sınırlar içinde saptanmıştır. Çalışmaya alınan hastalarımızın hiçbirinde tümör lizis sendromu görülmemiştir.

Tablo 10: Tanı Aşamasında Hastaların Bazı Biyokimyasal Parametrelerinin Ortalama Değerleri

Tanı	ALL (n=30)	AML (n=4)
B12 Vitamini (pg/mL)	320,07±277,76	589,50±255,45
25-OH D Vit (ng/mL)	15,54±7,68	12,68±4,42
Folik Asit (ng/mL)	5,23±3,51	6,57±4,11
Potasyum (mmol/L)	4,13±0, 39	4,20±0, 28
Fosfor (mg/dL)	4,58±0, 80	4,00±0, 69
Kalsiyum (mg/dL)	9,04±0, 58	8,60±0, 71
Ürik Asit (mg/dL)	4,38±1,52	3,25±1,25

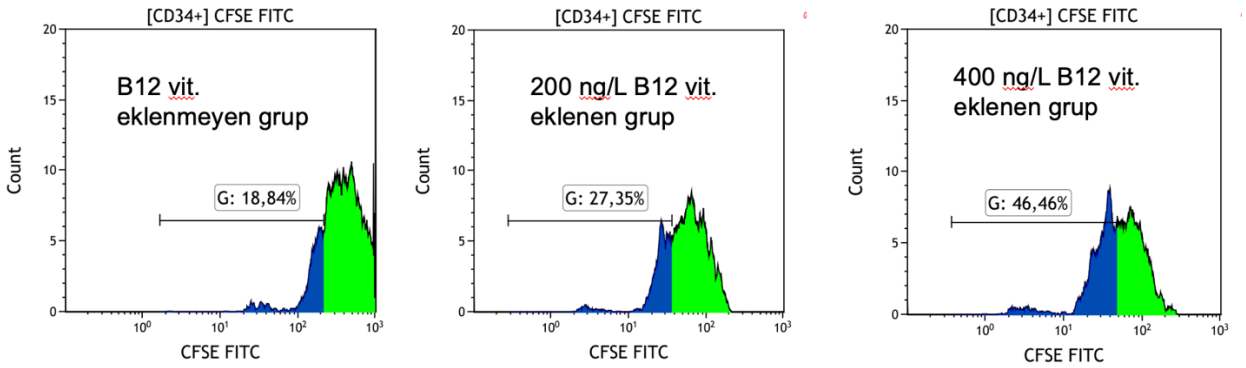
Çalışmada, hastaların akut lösemi tanısı için yapılan kemik iliği aspirasyonundan ayrılan ve besi yerine ekilen blastlardan vitamin eklenmeyecek olan grup ayrılmış, diğer iki gruba ortamda kan B12 vitamini normal düzeyi alt sınırında olacak şekilde (200 ng/L konsantrasyonu) ve kan B12 vitamini normal düzeyi alt sınırının iki katı olacak şekilde (400 ng/L konsantrasyonu) B 12 Vitamini besi yerlerine eklenmiştir. Bu besi yerlerindeki blast hücrelerinin 5 gün sonra (120 saat) yapılan değerlendirme sonuçları Tablo 11'de verilmiştir.

Blast hücrelerinde proliferasyon oranları 200 ng/L ve 400 ng/L B12 vitamini konsantrasyonlarında sırasıyla %10 ve %20 civarında artmış olsa da bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4). Canlı hücre sayısına yönelik karşılaştırmalarda ise B12 vitamini eklenmiş olan besiyerlerinde canlı hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur (p: **0,014)**. Canlı hücre sayısı 400 ng/L B12 vitamini konsantrasyonlarında 200 ng/L konsantrasyonlarından daha fazla artış göstermiştir (Şekil 5). Canlı hücrelerin karşılaştırmasında, gruplar arasındaki farklılığın nereden kaynaklandığını bulmak için gruplar Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, B12 vitamini eklenmeyen grup ile 400 ng/L B12 vitamini eklenmiş olan grup arasındaki farktan kaynaklandığı tespit edilmiştir **(p=0,029).**

Erken apopitoz fazında B12 vitaminin her iki düzeyinde de hücre sayısında ve apopitozda benzer oranda azalma görülmüştür (Şekil 5). Bu azalma istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur **(p: 0,001).** Erken apopitoz fazındaki hücrelerin karşılaştırmasında, gruplar arasındaki farklılığın nereden kaynaklandığını bulmak için gruplar Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, B12 vitamini eklenmeyen grup ile hem 200 ng/L, hem de 400 ng/L konsantrasyonu B12 vitamini eklenmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmüştür. (**Sırasıyla p=0,005 ve p=0,001**).

Ölü hücreler B12 vitaminin 200 ng/L konsantrasyonunda 400 ng/L konsantrasyonuna göre daha fazla artmıştır, fakat B12 vitamini eklenmeyen gruba göre artış oranında istatiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır. Geç apopitoz fazında B12 vitamini eklenmeyen gruba göre 200 ng/L konsantrasyonunda da, 400 ng/L konsantrasyonuna da apopitozda artma görülmüştür. Fakat bu artışlar istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (Tablo 11)

Şekil 5: B12 Vitamini Eklenen Grupta Akım Sitometride Proliferasyon Değerlendirmesi örneği



- G: Proliferasyon oranı
- B12 vit.: B12 vitamini

Tablo 11: Blast Hücrelerinin 200 ng/L ve 400 ng/L B12 Vitamini konsantrasyonlarına yanıtları

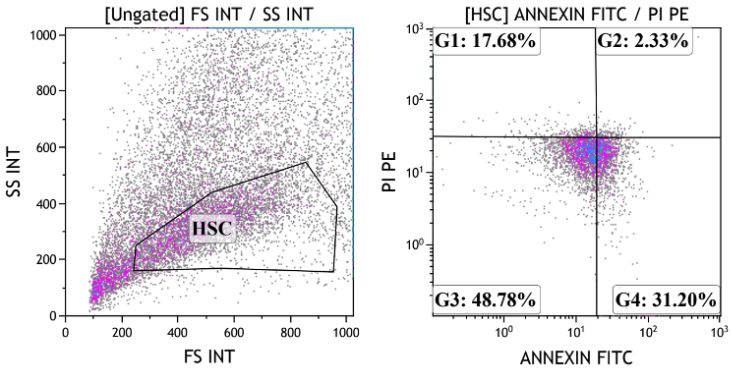
	B12 vitamini eklenmeyen-grup Ort ±SS	**200 ng/L konsantrasyonunda B12 vit. eklenmiş Ort ±SS**	**400 ng/L konsantrasyonunda B12 vit. eklenmiş Ort±SS**	**p****
Proliferasyon	22,19±24,97	24,59±26,26	26,53±27,73	0,549
Canlı Hücre	37,13±26,38	39,50±25,89	40,56±27,51	**0,014*****
Ölü Hücre	13,08±14,62	14,13±14,19	13,70±14,69	0,388
Erken Apopitoz	22,19±23,12	16,85±16,08	16,99±18,62	**0,001******
Geç Apopitoz	27,58±27,95	29,50±28,65	28,74±28,64	0,887

*Hücrelerdeki değişim oranı yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

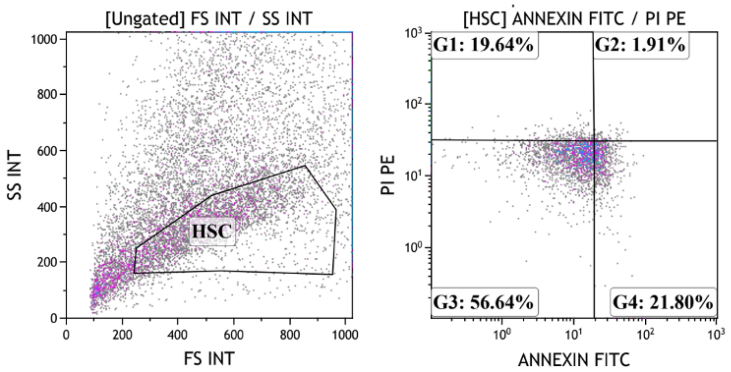
**Non Parametrik Tekrarlayan Ölçümlerde Varyans Analizi (Friedman testi) ile test edilmiştir.

***Canlı hücre karşılaştırmasında, gruplar arasındaki farklılığın nereden kaynaklandığını bulmak için gruplar Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, farklılığın B12 vitamini verilmeyen grup ile 400 ng/L B12 vitamini eklenmiş olan grup arasındaki farktan kaynaklandığı tespit edilmiştir **(p=0,029).**
****Erken apopitoz fazındak hücrelerin karşılaştırmasında, gruplar arasındaki farklılığın nereden kaynaklandığını bulmak için gruplar Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, farklılığın B12 vitamini verilmeyen grup ile hem 200 ng/L, hem de 400 ng/L B12 vitamini eklenmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulunmuştur (**sırasıyla p=0,005 ve p=0,001**).

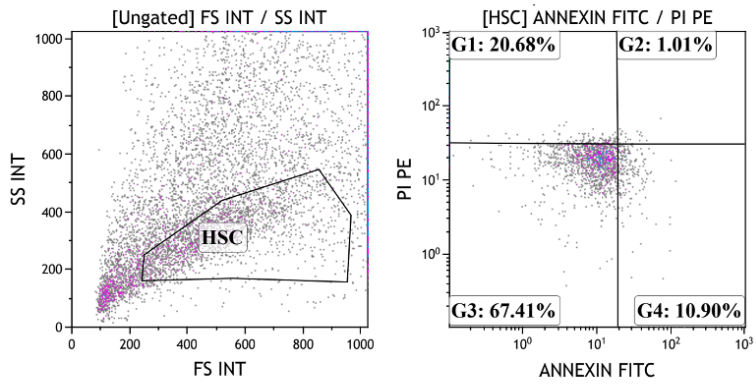
Şekil 6: B12 Vitamini Eklenen Grupta Akım Sitometride Annexin ile Canlılık, Apopitoz ve Ölü Hücre Değerlendirmesi örneği



B12 vit. Eklenmeyen grup



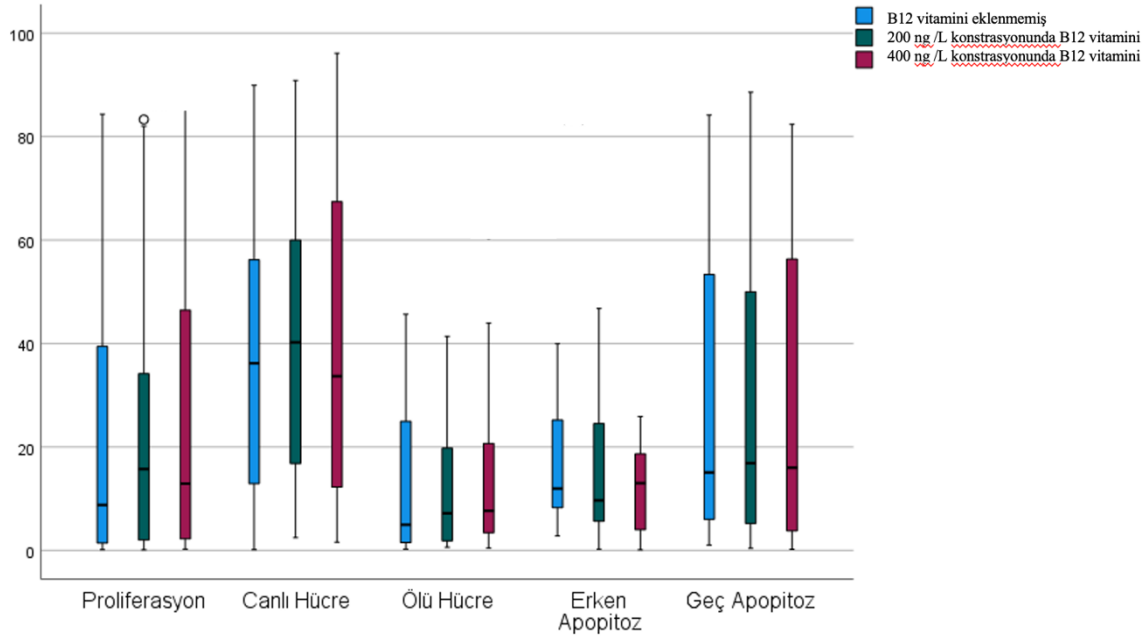
200 ng/L B12 vit. Eklenen grup



400 ng/L B12 vit. Eklenen grup

G1: ÖLÜ HÜCRE
G2: GEÇ APOPİTOZ
G3: CANLI HÜCRE
G4: ERKEN APOPİTOZ

Şekil 7: Blast Hücrelerinin 200 ng/L ve 400 ng/L B12 Vitamini Konsantrasyonlarına Yanıtları



Çalışmada, hastaların akut lösemi tanısı için yapılan kemik iliği aspirasyonundan ayrılan ve besi yerine ekilen blastlardan vitamin eklenmeyecek olan grup ayrılmış, diğer iki gruba 20µg/L ve 40 µg/L konsantrasyonlarında olacak şekilde 25-OH D vitamini besi yerlerine eklenmiştir. Bu besi yerlerindeki blast hücrelerinin 5 gün sonra (120 saat) yapılan değerlendirme sonuçları Tablo 8'de verilmiştir.

Blast hücrelerinde proliferasyon oranları 20 µg/L ve 40 µg/L D vitamini konsantrasyonlarında artmış olsa da artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Canlı hücre sayısı 40 µg/L konsantrasyonlarında artış göstermiştir fakat 20 µg/L konsantrasyonlarında azalma saptanmıştır. Bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ölü hücre sayısında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Erken apopitoz oranında 20 µg/L konsantrasyonlarında artış görülürken, 40 µg/L konsantrasyonlarında azalma saptanmıştır. Fakat bu sonuçlar istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Geç apopitoz fazında 20 µg/L konsantrasyonlarında azalma görülürken, 40 µg/L konsantrasyonlarında artış görülmüştür. Bu artış veya azalmada istatiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (ikisi için de $p>0.05$).

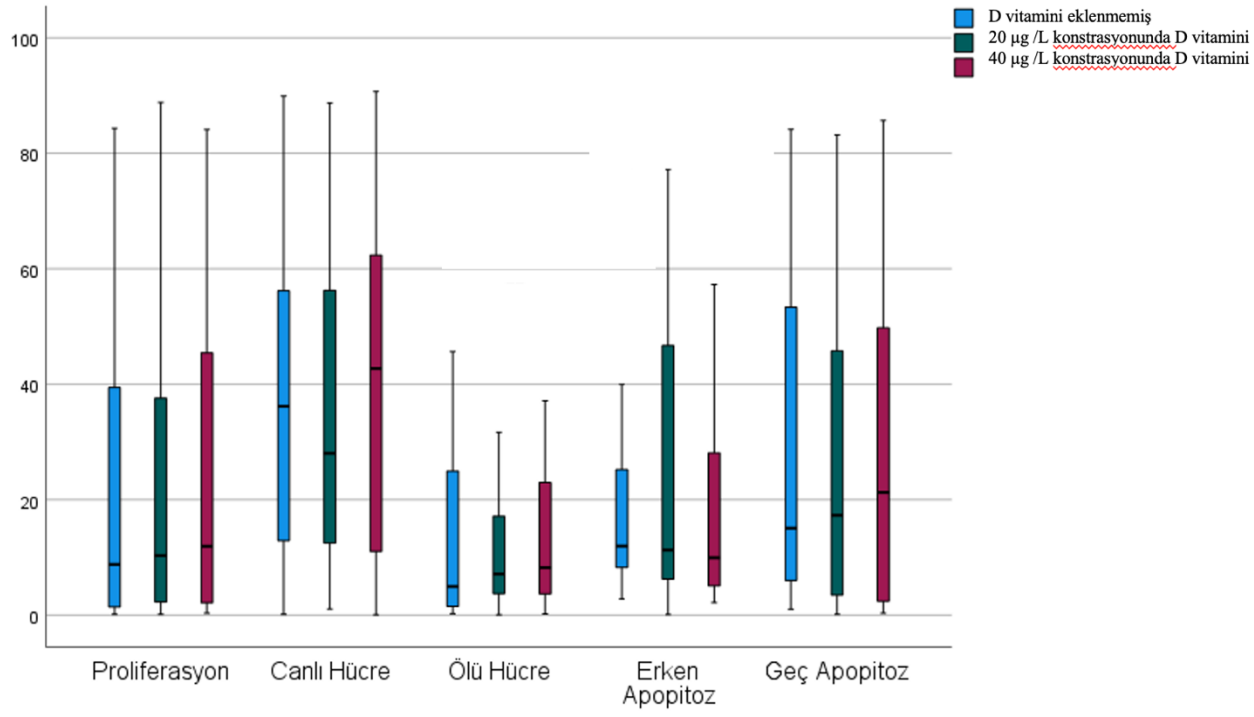
Tablo 12: Blast Hücrelerinin 20 µg/L ve 40 µg/L D Vitamini Konsantrasyonlarına Yanıtları

	25OH Vit D3 Eklenmeyen grup Ort ±SS	**20 µg/L konsantrasyonunda 25OH Vit D3 eklenmiş Ort ±SS**	**40 µg/L konsantrasyonunda 25OH Vit D3 eklenmiş Ort±SS**	**p**
Proliferasyon	22,19±24,97	24,03±27,37	25,11±27,95	0,107
Canlı Hücre	37,13±26,38	36,48±26,26	37,71±27,13	0,682
Ölü Hücre	13,08±14,68	13,48±15,51	13,38±14,07	0,373
Erken Apopitoz	22,19±23,12	23,49±24,10	18,06±18,70	0,157
Geç Apopitoz	27,58±27,95	26,85±28,37	30,89±29,98	0,139

*Hücrelerdeki değişim oranı yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

**Non Parametrik Tekrarlayan Ölçümlerde Varyans Analizi (Friedman testi) ile test edilmiştir.

Şekil 8: Blast Hücrelerinin 20 µg/L ve 40 µg/L D Vitamini Konsantrasyonlarına Yanıtları



Çalışmada hastaların tanı anındaki B12 düzeyleri ile kan sayımı değerleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir (Tablo 9). B12 vitamin düzeyi düşük olanlar ile normal olanlar karşılaştırılmıştır. B12 eksikliği olan grupta lökosit düzeyi %20 kadar daha düşük saptanmış fakat istatiksel olarak anlamlı saptanmamıştır (p= 0,362). B12 vitamini eksikliği olan grupta ortalama nötrofil sayısı %50'den fazla oranda daha düşük saptanmıştır, fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (p=0,082). Lenfosit ve hemoglobin düzeyleri benzer olarak bulunmuştur. (Sırasıyla p=0,675 ve p=0,972). B12 vitamin düzeyi düşük olan grupta ortalama trombosit sayısı eksiklik olmayan hasta grubuna göre %40 kadar daha düşük saptanmıştır. Fakat bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,675). Hastaların blast oranları B12 vitamini tanı anında düşük ve yüksek olan grup karşılaştırıldığında benzer saptanmıştır. İstatiksel bir fark bulunamamıştır (p=0,158).

Tablo 13: Tanı anındaki B12 vitamini değerleri ile tanı anındaki Hemogram değerleri ve Blast yüzdeleri arasındaki ilişki

	B12 vitamini> 200 ng/L (n=21)	**B12 vitamini<200 ng/L (n=13)**	**p**
WBC (/µL)	37709,52±42007,27	28069,23±46860,22	0,362
NEU (/µL)	3800,0±6480,2	1161,5±1183,6	0,082
LYMPH (/µL)	23733,3±31105,9	22884,6±44228,4	0,675
PLT (/µL)	105285,7±134771,3	63538,4±59442,7	0,675
HGB (g/dL)	7,7±2,7	7,6±2,5	0,972
BLAST ORANI (%)	73,95±22,34	69,84±15,63	0,158

- Mann Whitney U Analizi ile test edilmiştir.
- WBC: White Blood Cell (lökosit), NEU: Nötrofil, LYMPH: lenfosit, PLT: platelet (trombosit), HGB: hemoglobin

5. TARTIŞMA

Çalışmamız in vitro olarak inkübe edilen blast hücrelerine 200 ng/L ve 400 ng/L konstrasyonlarında B12 vitamini ve 20 µg/L ve 40 µg/L konstrasyonlarında D vitamini etkilerini göstermeyi amaçlamıştır. Çalışmanın sonucunda in vitro olarak blast hücrelerinin B12 vitamini etkisiyle canlılıklarının arttığı ve erken apopitoz oranlarının azaldığı gösterilmiştir. Ek olarak D vitaminin in vitro blastlar üzerinde etkisi olmadığı da gösterilmiştir. Literatürde in vitro ortamda deneysel olarak yapılarak blastlar üzerine B12 vitamininin etkisi gösterilen bir çalışma bulunmamaktadır.

Akut lösemiler çocukluk çağı kanserleri içinde en yaygın olandır (1-3). ALL en sık 2-6 yaşlar arasında izlenirken, Akut Miyeloblastik Lösemi (AML) sıklığı 0-2 yaş ve adölesan yaş grubunda pik yapar. Akut lösemi şüphesi olan hastalarda kemik iliği aspirasyonunun mikroskopla incelenmesi, moleküler testler, sitogenetik analizi ve immünfenotipleme ile kesin tanı koyulabilmektedir (1, 2, 4). Akut lösemilerin karakteristik periferik kan bulguları anemi, trombositopeni ve periferik yaymada blastik hücrelerin varlığıdır (34, 36). Bizim hasta grubumuzda da literatürle benzer olarak(1), yaklaşık hastaların %80'ninde anemi ve %85 oranında trombositopeni saptanmıştır. Hastaların yarısından fazlası (%58) lökositoz ile başvurmuş ve tanı almıştır.

Ülkemizde 0-18 yaş grubunda B12 vitamini ve D vitamini eksikliği yaygın olarak görülmektedir (6-9). Toplumda yaygın olarak görülmesi nedeniyle yeni akut lösemi (AL) tanısı alan hastalarda da yaygın olarak B12 ve D vitamin eksiklikleri görülmekte ve replasman tedavisi gerekmektedir (7, 9-11). Bu nedenlerle AL tanısı alan hastaların tedavi süreci başlarken rutin tarama amaçlı gönderilen tetkiklerde B12 vitamini (Kobalamin) ve D vitamini (25-hidroksi Vitamin D) düzeyleri kliniğimizde de bakılmaktadır. Hastalarda vitamin eksikliği saptanması durumunda, hastanın AL tedavi protokolüne göre belirli zamanlarda vitamin replasman tedavileri eklenmektedir.

Marmara Üniversitesi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalına başvuran ve AL tanısı alan hastalarda geriye dönük olarak yapılan bir incelemede 2017-2020 yılları arasında taranan 88 AL tanılı hastanın %51'nin tanı anında B 12 eksikliği olduğu görülmüştür (12). Bizim çalışmamızda, çalışmaya dahil edilen hastalardan 21'inin (% 61,8) B12 Vitamini değerleri tanı anında normal iken (>200ng/L), 13'ünde (%38,2) eksiklik tespit edilmiştir.

Literatüre bakıldığında Türkiye'nin değişik bölgelerinde yapılan çalışmalarda da B12 vitamini eksikliği yüksek saptanmaktadır (7, 9, 68, 69). Yetim A. ve ark. adölesan grubunda yaptığı çalışmada vakaların %35.6'sında B12 vitami düzeyi <200 ng/L altında saptanmıştır (69). Şanlıurfa bölgesinde yapılan bir çalışmada, B 12 vitamini eksikliğinin gebelerde %72 ve bebeklerin kordon kanlarında %41 gibi yüksek bir oranda olduğu tespit edilmiştir (9). Elgörmüş ve ark. 6-72 ay grubunda yaptığı çalışmada da (71) çocukların %31,6'nda B12 düzeyi < 200 ng/L, %25'nde B12 düzeyi 200-299 ng/L bulunmuştur. Ertaş T. ve ark. yaptığı çalışmada (15) 6-12 ay yaş grubu 211 çocuk değerlendirilmiş ve %84.7'sinde B12 vitamini eksikliği saptanmıştır.

Marmara Üniversitesi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalına başvuran ve AL tanısı alan hastalarda geriye dönük olarak yapılan önceki bir çalışmada D vitamini düzeyleri 88 hastanın 65'inde (%80.2) <20 µg/L'nin altında bulunmuştur (12). Bizim çalışmamızda da benzer olarak, 34 hastanın tanı anında 5 tanesinde (%14,7) D Vitamini düzeyleri normal değerlerde (>20 ng/mL), 17 hastada (%50,0) D Vitamini düzeyleri yetersiz (12-20 ng/mL), 12 hastada (%35,3) D Vitamini düzeyleri düşük olarak (<12 ng/mL) olarak saptanmıştır. Eker F. ve ark. yaptığı çalışmada (8) lösemi tanısı alan çocuklar ile kontrol grubu çocukların D vitamini düzeyleri karşılaştırılmıştır. D vitamini eksikliği bizim çalışmamızla benzer olarak akut lösemi grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek oranda saptanmıştır. Akut lösemi tanısı olan çocuklarda yaygın D vitamini eksikliği olduğu gösterilmiştir. Hocaoğlu-Emre ve ark. çalışmasında (6) 2017-2018 senelerinde İstanbul'da yaşayan 640 anaokulu öğrencisi D vitamini eksikliği açısından taranmıştır. 485 öğrencinin (%75.78) D vitamini seviyesi >20 µg/L olarak saptanmıştır. Bu çalışmalar Akut lösemi tanısı alan çocukların toplumdan daha sık D vitamini eksikliği olduğunu göstermektedir. Bu sebeple AL tanısı alan hastalarımızın çoğuna D vitamini replasman tedavisi düzenlenmektedir. Biz de bu deneysel çalışmayla hastalarda tanı anında bulunan vitamin eksikliklerinin kemoterapi başlangıcında düzeltilmesinin doğruluğunu değerlendirmeyi amaçladık.

Kliniğimizdeki uygulamada hastalarımızda B12 vitamini eksikliği saptandığında hastada tedaviyle remisyon sağlanana kadar vitamin replasmanı yapılmamaktadır. Hastalar remisyona girene kadar B12 eksikliğine maruz kalmaktadırlar. Çocukluk döneminde B12 vitamini eksikliğinin hem büyümeyi hem de nörokognitif gelişimi etkilediği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (14, 15). Sneha Tandon ve ekibi, Hindistan'da yeni AL tanısı alan 58 çocukta yaptıkları araştırmada tanı anındaki B12 vitamini ve folat düzeyinin

tedaviyle ilişkisini değerlendirmişlerdir. Tanı anında B12 vitamin eksikliği olan hastaların, tedavi protokolünün indüksiyon döneminde kemoterapi yan etkilerini daha ağır yaşadığı görülmüştür. Bu araştırma indüksiyon dönemi öncesinde B12 vitamini replasmanı vermenin hastayı toksik etkilerden korumak için önemli olduğunu ortaya koymakla beraber, tartışma bölümünde B12 vitamini tedavisinin kemoterapinin blast hücreleri üzerindeki etkisini azaltmasından çekinildiği de vurgulanmıştır (16). Minnet ve ark. çalışmasında (17) B12 vitamini eksikliği olan hastalarda mononükleer hücrelerde DNA hasarının arttığı ve B12 vitamini tedavisinin DNA hasarını azalttığı gösterilmiştir. Bu etkinin lösemik blastlar üzerinde kemoterapinin yol açacağı DNA hasarını azaltma şeklinde ortaya çıkabilmesi de muhtemeldir.

Bunun yanı sıra B12 Vitamininin, DNA sentezinde ve protein sentezinde 2 ana noktada kofaktör olarak kullanılması (13), B12 vitamini tedavisi vermenin blast hücrelerinin canlılığını artıracağı ve hastaların remisyona girmesini geciktireceğini de düşündürmektedir. B12 vitaminin DNA sentezindeki görevleri sebebiyle blastlarda da DNA sentezini desteklediği ve protein sentezini artırarak blastların hayatta kalma, bölünme ve çoğalma şansını artıracağı öngörülmektedir. Bu hipoteze dayanarak çalışmamızda hastalardan alınan blastların olduğu besi yerlerine kan B12 vitamini normal düzeyi alt sınırında (200 ng/L konsantrasyonunda) olacak şekilde ve kan B12 vitamini normal düzeyi alt sınırının iki katı (400 ng/L konsantrasyonunda) olacak şekilde B 12 Vitamini eklenmiştir. 5 gün boyunca besi yerlerinde durduktan sonra proliferasyon ve annexin V ile değerlendirme yapılmıştır. Blast hücrelerinde proliferasyon oranları 200 ng/L ve 400 ng/L B12 vitamini konsantrasyonlarında sırasıyla %10 ve %20 civarında artmıştır, bu artış istatiksel olarak anlamlı saptanmamıştır fakat bu durum hasta sayımızın az olması ve dağılımın fazla olmasından da kaynaklanmaktadır.

Canlı hücre sayısı 400 ng/L B12 vitamini konsantrasyonlarında 200 ng/L konsantrasyonlarından daha fazla artış göstermiştir. Canlı hücre sayısındaki bu artış istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p: **0,014)**. Bu da göstermektedir ki B12 vitamini blast hücrelerinin canlılığını artırmaktadır. Bu sonucun B12 vitamininin DNA ve protein sentezindeki görevleriyle ilişki olduğu düşünülmektedir. B12 düzeyinin daha yüksek olduğu ortamda (400 ng/L konstrasyonu) canlılığın anlamlı olarak artması daha yüksek B12 vitamini konstrasyonlarının blastlara daha çok fayda sağladığını düşündürmektedir.

Çalışmanın erken apopitoz fazında B12 vitaminin her iki düzeyinde de hücre sayısında ve apopitozda benzer oranda azalma görülmüştür. Bu azalma istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur **(p: 0,001).** Blast hücrelerinin erken apopitozunda azalma olması hasta remisyona girene kadar B12 vitamini verilmemesinin doğruluğunu kanıtlar niteliktedir. Özellikle hastalara indüksiyon kemoterapisi verilme aşamasında verilen Glukortikordikoid tedavisinin amacı blastların erken apopitoz fazına etki ederek (94), blast hücrelerinin ölümünü hızlandırmaktır. Hücre kültüründe blast hücrelerinin canlılığı ve apopitozu üzerinden elde edilen verilere dayanarak, akut lösemi tanısı almış çocuklarda B12 vitamini tedavisinin remisyona girilene kadar ertelenmesinin uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Çalışmamızda hastaların tanı anındaki folik asit değerlerine göre de değerlendirme yapılmıştır. Çalışmaya dahil olan hastaların 21'inin (% 61,8) tanı aşamasında folik asit düzeyleri normal sınırlarda (>3.8 mcg/L) iken, 13'ünün düzeyleri (%38,2) düşük (<3.8 mcg/L) bulundu. Başlangıç folik asit düzeyleri ile besi yerinde inkübe olan blastların B12 vitaminine olan proliferasyon, canlılık ve apopitoz yanıtlarını istatiksel olarak Spearman Korelasyon testi ile değerlendirdik. Bulgularımıza göre hastaların tanı sırasındaki folik asit düzeylerinin düşük veya yüksek olması blastların besiyerine eklenen B12 vitaminine verdiği cevabı etkilememektedir.

Hastaların tanı anındaki B12 vitamini düzeylerine göre hemogram değerleri ile tanı anındaki blast oranları karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmasa da B12 vitamini eksikliği olan grupta lökosit düzeyi %20 kadar daha düşük bulunmuştur. Ayrıca B12 vitamini normal olan grupta ortalama nötrofil sayısı B12 düzeyi düşük olan gruba göre %50 daha fazla saptanmıştır, fakat bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Lenfosit ve hemoglobin düzeyleri benzer olarak bulunmuştur. B12 düzeyi düşük olan grupta ortalama trombosit sayısı %40 kadar daha düşük saptanmıştır. B12 vitamini tanı anında düşük ve yüksek olan grup karşılaştırıldığında hastaların blast oranları benzer saptanmıştır. Hastaların blast oranı her iki grupta da benzerken lökosit, nötrofil ve trombosit sayılarının B12 vitamini eksikliği olan grupta daha düşük saptanması blast hücrelerinin B12 vitaminini kullanarak diğer hücrelerin gelişmesini engellediğini ve kemik iliği baskılanmasının B12 vitamini eksikliği olan grupta daha şiddetli olduğunu göstermektedir. Bu sonuç blast hücrelerinin B12 vitamininden fayda sağladığını destekleyen bir bulgudur.

D vitamini eksikliğinin kanser gelişim riskinde artış ile ilişkili olduğu (22), kendisinin veya metabolitlerinin bazı kanser hücrelerine sitotoksik etki gösterdiği veya insan miyeloid lösemi hücrelerinin in vitro büyümesini baskıladığı önceki çalışmalarca bildirilmiştir (18, 19). Bu nedenle pek çok klinikte, D vitamini eksikliğinin, akut lösemi hastalarındaki prognoz üzerine de etkili olabileceği düşünülerek, tedavi öncesinde her lösemi hastasında D vitamini taraması da yapılmaktadır (8). 25-OH Vitamin D'nin, bilinen bir hücre proliferasyonu etkisi olmadığı için, eksikliği saptanması durumunda kliniğimizde doğrudan D vitamini replasman tedavisi başlanmaktadır. Ayrıca, D vitamini, kalsiyum ve fosforun bağırsak emilimini ve kemik mineralizasyonunu arttırıcı etki gösterir (11). Yapılan çalışmalarda hematolojik malignite tanısı nedeniyle kemoterapi alan çocuklarda, D vitamini eksikliğinin uzun dönemde uzun kemik fraktürlerine eğilimi ve osteoporoz riskini artırdığı saptanmış olup D vitamini tedavisinin, vitamin eksikliği saptandığı anda başlanması önerilmektedir (20, 21). Bu sebeple deney ortamında hastalarımızdan aldığımız blast hücrelerini hücre kültürüne ekledikten sonra 20 µg/L ve 40 µg/L konsantrasyonlarında olacak şekilde 25-OH D vitamini besi yerlerine eklenmiştir. Bu besi yerlerindeki blast hücrelerinin 5 gün sonra (120 saat) yapılan değerlendirme sonuçlarında proliferasyon oranları 20 µg/L ve 40 µg/L D vitamini konsantrasyonlarında artmış olsa da artış istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Antony ve arkadaşları da ALL tanılı hastalardan aldıkları blast hücrelerini in vitro ortamda D vitamini vererek yaptıkları çalışmada da benzer sonuçlara ulaşmışlardır (22). Canlı hücre sayısı 40 µg/L konsantrasyonlarında artış göstermiştir fakat 20 µg/L konsantrasyonlarında azalma saptanmıştır. Erken apopitoz oranında 20 µg/L konsantrasyonlarında artış görülürken, 40 µg/L konsantrasyonlarında azalma saptanmıştır. Geç apopitoz fazında 20 µg/L konsantrasyonlarında azalma görülürken, 40 µg/L konsantrasyonlarında artış görülmüştür. Bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Sonuç olarak, çalışmamızda hastaların tanı anında eksikliği saptanırsa D vitamini tedavisi almalarına engel teşkil edecek bir sonuca ulaşamadık. D vitaminin doğrudan DNA veya protein sentezine etkisi olmaması bu sonucu desteklemektedir. Ek olarak çocukların uzun dönemde D vitamini eksikliğine maruz kalmalarını gerektirecek bir bulgu saptanamamıştır. Tanı anında eksikliği saptandığında D vitamini replasman tedavisi başlanması önerilmektedir.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmaya akut lösemi tanısı alan 34 hasta alınmıştır. 34 hastanın 30'u (%88,2) ALL, 4'ü (%11,8) AML tanısı almıştır.
2. Hastaların 18'i (%52,9) kız, 16'sı (%47,1) erkektir ve yaş ortalaması 95,15±59,65 ay (min: 12,0 ay – max: 207,0 ay)'dır.
3. Çalışmaya dahil edilen hastalardan 21'inin (% 61,8) B12 Vitamini değerleri tanı anında normal iken (>200ng/L), 13'ünde (%38,2) eksiklik tespit edilmiştir.
4. Tanı anında 5 hastanın (%14,7) D Vitamini düzeyleri normal değerlerde (>20 ng/mL), 17 hastanın (%50,0) D Vitamini düzeyleri yetersiz (12-20 ng/mL), 12 hastanın (%35,3) D Vitamini düzeyleri düşük olarak (<12 ng/mL) olarak saptanmıştır.
5. Çalışmaya alınan hastalarımızın hiçbirinde tümör lizis sendromu görülmemiştir.
6. 200 ng/L ve 400 ng/L konsantrasyonlarında B12 vitamini eklenen besiyerlerinde blast hücrelerinde proliferasyon oranları sırasıyla %10 ve %20 civarında artmış olsa da bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
7. B12 vitamini eklenen grupta canlı hücre sayısındaki artış istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p: **0,014)**.
8. B12 vitamini eklenen grupta erken apopitoz fazında B12 vitaminin her iki düzeyinde de apopitozda benzer oranda azalma görülmüştür. Bu azalma istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur **(p: 0,001).**
9. B12 vitamini eklenen grupta ölü hücreler B12 vitaminin 200 ng/L konsantrasyonunda 400 ng/L konsantrasyonuna göre daha fazla artmıştır, fakat artış oranı istatiksel anlamlı bulunmamıştır.
10. B12 vitamini eklenen grupta geç apopitoz fazında 200 ng/L konsantrasyonunda da 400 ng/L konsantrasyonuna da artma görülmüştür. Bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
11. **B12 vitamini eklenen grupta in vitro ortamda B12 vitaminin blast hücrelerinin canlılığını artırdığı ve apopitozunu azalttığı gösterilmiştir.**
12. D vitamini eklenen grupta blast hücrelerinde proliferasyon oranları 20 µg/L ve 40 µg/L D vitamini konsantrasyonlarında artmış olsa da artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

13. D vitamini eklenen grupta canlı hücre sayısı 40 µg/L konsantrasyonlarında artış göstermiştir fakat 20 µg/L konsantrasyonlarında azalma saptanmıştır. Bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).
14. **D vitaminin in vitro olarak blast hücrelerinin canlılığına ve proliferasyonuna etkisi olmadığı gösterilmiştir.**
15. Çalışmada hastaların tanı anındaki B12 vitamini düzeyleri ile kan sayımı değerleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. B12 vitamini eksikliği olan grupta lökosit sayısı %20 kadar daha düşük saptanmıştır. Fakat bu farklılık istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
16. B12 vitamini eksikliği olan ve olmayan gruplarda lenfosit ve hemoglobin düzeyleri benzer olarak bulunmuştur. B12 düzeyi düşük olan grupta ortalama trombosit sayısı %40 kadar daha düşük saptanmıştır. Bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
17. Çalışmada hastaların tanı anındaki B12 vitamini düzeyleri ile blast oranları karşılaştırılmıştır. B12 vitamini tanı anında düşük ve yüksek olan grup karşılaştırıldığında blast oranları benzer bulunmuştur. İstatiksel bir fark bulunamamıştır.

7. KAYNAKÇA

1. Pillai M.P. CWP. Acute Leukemia Lanzkowsky P Manual of Pedıatrıc, Hematology and Oncology (7th ed) Elsevier Science18 p. p: 143-57.
2. Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Clin North Am. 2015;62(1):47-60.
3. Coccaro N, Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Albano F. Next-Generation Sequencing in Acute Lymphoblastic Leukemia. Int J Mol Sci. 2019;20(12).
4. Poplack D, Morgolin J. Management of common cancers of childhood. Principles and practice of pediatric oncology I Philadelphia. 1997:409-504.
5. Nijmeijer BA, Szuhai K, Goselink HM, van Schie ML, van der Burg M, de Jong D, et al. Long-term culture of primary human lymphoblastic leukemia cells in the absence of serum or hematopoietic growth factors. Exp Hematol. 2009;37(3):376-85.
6. Hocaoglu-Emre FS, Saribal D, Oguz O. Vitamin D Deficiency and Insufficiency According to the Current Criteria for Children: Vitamin D Status of Elementary School Children in Turkey. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2019;11(2):181-8.
7. Boran P, Yildirim S, Karakoc-Aydiner E, Ogulur I, Ozen A, Haklar G, et al. Vitamin B12 deficiency among asymptomatic healthy infants: its impact on the immune system. Minerva Pediatr (Torino). 2021;73(1):59-66.
8. Eker F, Olcay L. Lösemili çocuklarda tedavi öncesindeki folik asit, vitamin B12 ve 25-hidroksi vitamin D eksiklik ve yüksekliğinin sıklığı ve remisyona giriş ile ilişkisi. Cocuk Sagligi ve Hastaliklari Dergisi. 2015;58(4).
9. Koc A, Kocyigit A, Soran M, Demir N, Sevinc E, Erel O, et al. High frequency of maternal vitamin B12 deficiency as an important cause of infantile vitamin B12 deficiency in Sanliurfa province of Turkey. Eur J Nutr. 2006;45(5):291-7.
10. Cetinkaya F, Yildirmak Y, Kutluk G, Erdem E. Nutritional vitamin B12 deficiency in hospitalized young children. Pediatr Hematol Oncol. 2007;24(1):15-21.
11. Andiran N, Celik N, Akca H, Dogan G. Vitamin D deficiency in children and adolescents. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2012;4(1):25-9.
12. Şenay R.E. Tufan-Tas B., Koc A. Akut Lösemili Çocuk Hastalarda Tanı Sırasında B12- Vitamini ve Folik Asit Eksikliği Sıklığı ve Kan Sayımı Değerleri Üzerine Etkileri, . 8 Marmara Pediatri Kongresi,.

13. Allen LH. Vitamin b-12. Advances in Nutrition. 2012;3(1):54-5.

14. Demir N, Koc A, Üstyol L, Peker E, Abuhandan M. Clinical and neurological findings of severe vitamin B12 deficiency in infancy and importance of early diagnosis and treatment. J Paediatr Child Health. 2013;49(10):820-4.

15. Ertaş T, Koç A, Koçyiğit A, Baz T. Bebeklerin nöro-motor, sosyal ve fiziksel gelişmeleri üzerine B 12 vitamini eksikliğinin etkileri. Cocuk Sagligi ve Hastaliklari Dergisi. 2011;54(2).

16. Tandon S, Moulik NR, Kumar A, Mahdi AA, Kumar A. Effect of pre-treatment nutritional status, folate and vitamin B12 levels on induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. Indian pediatrics. 2015;52:385-9.

17. Minnet C, Koc A, Aycicek A, Kocyigit A. Vitamin B12 treatment reduces mononuclear DNA damage. Pediatr Int. 2011;53(6):1023-7.

18. Fathi N, Ahmadian E, Shahi S, Roshangar L, Khan H, Kouhsoltani M, et al. Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019;109:391-401.

19. Raimondi S, Pasquali E, Gnagnarella P, Serrano D, Disalvatore D, Johansson HA, et al. BsmI polymorphism of vitamin D receptor gene and cancer risk: a comprehensive meta-analysis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2014;769:17-34.

20. van Atteveld JE, Verhagen IE, van den Heuvel-Eibrink MM, van Santen HM, van der Sluis IM, Di Iorgi N, et al. Vitamin D supplementation for children with cancer: A systematic review and consensus recommendations. Cancer Med. 2021;10(13):4177-94.

21. Jackmann N, Makitie O, Harila-Saari A, Gustafsson J, Nezirevic Dernroth D, Frisk P. Vitamin D status in children with leukemia, its predictors, and association with outcome. Pediatr Blood Cancer. 2020;67(4):e28163.

22. Antony R, Sheng X, Ehsanipour EA, Ng E, Pramanik R, Klemm L, et al. Vitamin D protects acute lymphoblastic leukemia cells from dexamethasone. Leukemia Research. 2012;36(5):591-3.

23. Khammissa R, Fourie J, Motswaledi M, Ballyram R, Lemmer J, Feller L. The biological activities of vitamin D and its receptor in relation to calcium and bone homeostasis, cancer, immune and cardiovascular systems, skin biology, and oral health. BioMed research international. 2018;2018.

24. Huss L, Butt ST, Borgquist S, Elebro K, Sandsveden M, Rosendahl A, et al. Vitamin D receptor expression in invasive breast tumors and breast cancer survival. Breast Cancer Research. 2019;21(1):1-13.

25. Yilmaz B, Tokuc GA, Koc A, Yesil E. Investigation of vitamin D receptor gene polymorphism in pediatric patients with brain cancer. Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology. 2017;38(02):128-32.

26. SEER S. Explorer: An interactive website for SEER cancer statistics. Surveillance Research Program, National Cancer Institute. 2021.

27. Kliegman RM. Nelson textbook of pediatrics. 21st edition. ed. Philadelphia, MO: Elsevier; 2019. 2649-56 p.

28. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. The Lancet. 2020;395(10230):1146-62.

29. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. N Engl J Med. 2015;373(16):1541-52.

30. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA: a cancer journal for clinicians. 2018;68(1):7-30.

31. Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997;94(25):13950-4.

32. Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A, Olsson L, Rissler M, Castor A, et al. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Nature genetics. 2015;47(6):672-6.

33. Jerchel IS, Hoogkamer AQ, Ariës IM, Steeghs E, Boer J, Besselink NJ, et al. RAS pathway mutations as a predictive biomarker for treatment adaptation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2018;32(4):931-40.

34. Licthman M, Beutler E, Selishon U, Kaushanasky K, Kıpss T. Acute Lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia. Williams Hematology. 2007:87-91.

35. Yesilipek M.A. OH. Yurdakök Pediatri. 2017;Lösemiler:3364-70.

36. Owen P, Ian M. Clinical features and therapy of lymphoblastic leukemia. Pediatric Hematology. 2006;20:450-87.

37. Nathan DG, Oski FA. Nathan and Oski's Hematology and Oncology of Infancy and Childhood: Elsevier/Saunders; Acute Lymphoblastic Leukemia;2015.; 50;433-98

38. Jang W, Park J, Kwon A, Choi H, Kim J, Lee GD, et al. CDKN2B downregulation and other genetic characteristics in T-acute lymphoblastic leukemia. Experimental & molecular medicine. 2019;51(1):1-15.
39. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris IV JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. Science. 2004;306(5694):269-71.
40. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. The Journal of clinical investigation. 2012;122(10):3398-406.
41. Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, et al. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. Nature medicine. 2007;13(10):1203-10.
42. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-2405. Blood. 2016;128(3):462-3.
43. Béné M, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. Leukemia. 2011;25(4):567-74.
44. Pulte D, Gondos A, Brenner H. Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century. Blood, The Journal of the American Society of Hematology. 2009;113(7):1408-11.
45. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). Blood, The Journal of the American Society of Hematology. 2009;113(18):4153-62.
46. Aziz Z, Zahid M, Mahmood R, Maqbool S. Modified BFM protocol for childhood acute lymphoblastic leukemia: a retrospective analysis. Med Pediatr Oncol. 1997;28(1):48-53.
47. Berry DA, Zhou S, Higley H, Mukundan L, Fu S, Reaman GH, et al. Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. JAMA oncology. 2017;3(7):e170580-e.
48. De Rooij JD, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink M. Pediatric AML: from biology to clinical management. Journal of clinical medicine. 2015;4(1):127-49.

49. Shukla N, Walsh MF, Walter RB, Altman JK, Mandernach MW, Naik RP, et al. Acute myeloid leukemia. American Society of Hematology Self-Assessment Program: American Society of Hematology Washington, DC; 2022. p. 0.
50. O'Dwyer K, Freyer DR, Horan JT. Treatment strategies for adolescent and young adult patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2018;132(4):362-8.
51. Howlader N, Noone A, Krapcho Me, Miller D, Bishop K, Altekruse S, et al. SEER cancer statistics review, 1975-2013, national cancer institute. bethesda, MD. 2016.
52. Seif AE. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis. Cancer genetics. 2011;204(5):227-44.
53. Hahn CN, Chong C-E, Carmichael CL, Wilkins EJ, Brautigan PJ, Li X-C, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. Nature genetics. 2011;43(10):1012-7.
54. Creutzig U, van Den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, de Bont E, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. Blood, The Journal of the American Society of Hematology. 2012;120(16):3187-205.
55. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the French-American-British Cooperative Group. Annals of internal medicine. 1985;103(4):620-5.
56. Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. Leukemia. 2003;17(2):277-82.
57. Kaspers G, Zimmermann M, Reinhardt D, Gibson B, Tamminga R, Aleinikova O, et al. Improved outcome in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: results of a randomized trial on liposomal daunorubicin by the International BFM Study Group. J Clin Oncol. 2013;31(5):599-607.
58. Sander A, Zimmermann M, Dworzak M, Fleischhack G, Von Neuhoff C, Reinhardt D, et al. Consequent and intensified relapse therapy improved survival in pediatric AML: results of relapse treatment in 379 patients of three consecutive AML-BFM trials. Leukemia. 2010;24(8):1422-8.
59. Organization WH. Vitamin and mineral requirements in human nutrition: World Health Organization; 2004.

60. Al Amin ASM, Gupta V. Vitamin B12 (Cobalamin). StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.; 2023.
61. Seetharam B, Yammani RR. Cobalamin transport proteins and their cell-surface receptors. Expert reviews in molecular medicine. 2003;5(18):1-18.
62. Berlin H, Berlin R, Brante G. Oral treatment of pernicious anemia with high doses of vitamin B12 without intrinsic factor. Acta Medica Scandinavica. 1968;184(1-6):247-58.
63. Smith C, Marks A, Lieberman M. Mark's Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım. 2. baskı. Çeviri editörleri, Đnal ME, Atik U, Aksoy N, Haşimi A) Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri Yayınları. 2007.
64. Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V. Harper Biyokimya. 25. baskı. Çeviri Editörleri, Dikmen N, Özgünen T) Đstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Yayınları. 2004.
65. Manoli I SJ, Venditti CP. Isolated Methylmalonic Acidemia. 2005 Aug 16 [Updated 2022 Sep 8]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Figure 1. [Major pathway of the conversion...]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1231/figure/mma.F1/.
66. Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen AL, Brito A, Guéant JL, Miller JW, et al. Vitamin B(12) deficiency. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17040.
67. O'Leary F, Samman S. Vitamin B12 in health and disease. Nutrients. 2010;2(3):299-316.
68. Sayar EH, Orhaner BB, Sayar E, NesrinTuran F, Küçük M. Yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde B 12 vitamini, demir, folik asit eksikliğinin sıklığı ve maternal düzeylerle ilişkisi. Türk Pediatri Arşivi. 2020;55(2).
69. Yetim A., Tıkız C., Firdevs B. Ergenlik döneminde D ve B12 vitamin eksikliklerinin sıklığı. Çocuk Dergisi. 2017;17(1):24-9.
70. Kadiyala A, Palani A, Rajendraprasath S, Venkatramanan P. Prevalence of Vitamin B12 Deficiency among Exclusively Breast Fed Term Infants in South India. J Trop Pediatr. 2021;67(1).
71. Elgormus Y, Okuyan O, Dumur S, Sayili U, Uzun H. The Epidemiology of Deficiency of Vitamin B12 in Preschool Children in Turkey. Medicina (Kaunas). 2023;59(10).
72. Gutierrez A, Armstrong S, Look A, Hoffman R, Benz E, Silberstein L, et al. Pathobiology of acute lymphoblastic leukemia. Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop

H, Weitz J, Anastasi, editors Hematology: basic principles and practice 6th ed Elsevier. 2013:935-50.

73. Bicakci Z. Growth retardation, general hypotonia, and loss of acquired neuromotor skills in the infants of mothers with cobalamin deficiency and the possible role of succinyl-CoA and glycine in the pathogenesis. Medicine (Baltimore). 2015;94(9):e584.

74. Rasmussen SA, Fernhoff PM, Scanlon KS. Vitamin B12 deficiency in children and adolescents. The Journal of pediatrics. 2001;138(1):10-7.

75. Bensky MJ, Ayalon-Dangur I, Ayalon-Dangur R, Naamany E, Gafter-Gvili A, Koren G, et al. Comparison of sublingual vs. intramuscular administration of vitamin B12 for the treatment of patients with vitamin B12 deficiency. Drug Deliv Transl Res. 2019;9(3):625-30.

76. Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis. 2001;475(1-2):7-20.

77. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. 2017;18:153-65.

78. Kliegman RM. Vitamin D deficiency. NELSON 1. 21TH ed2020. p. 375-80.

79. Audran M, Kumar R, editors. The physiology and pathophysiology of vitamin D. Mayo Clinic Proceedings; 1985: Elsevier.

80. Fraser DR. Vitamin D. Lancet. 1995;345(8942):104-7.

81. Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An Update on Vitamin D Metabolism. Int J Mol Sci. 2020;21(18).

82. Carlberg C, Raczyk M, Zawrotna N. Vitamin D: A master example of nutrigenomics. Redox Biol. 2023;62:102695.

83. Munns CF, Shaw N, Kiely M, Specker BL, Thacher TD, Ozono K, et al. Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. Hormone Research in Paediatrics. 2016;85(2):83-106.

84. Schleicher RL, Sternberg MR, Looker AC, Yetley EA, Lacher DA, Sempos CT, et al. National Estimates of Serum Total 25-Hydroxyvitamin D and Metabolite Concentrations Measured by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in the US Population during 2007-2010. J Nutr. 2016;146(5):1051-61.

85. Alpdemir M, Alpdemir MF. Meta Analysis Vitamin D deficiency status in Turkey: A meta-analysis. Int J Med Biochem. 2019;2(3):118-31.

86. Oden Akman A, Tumer L, Hasanoglu A, Ilhan M, Caycı B. Frequency of vitamin D insufficiency in healthy children between 1 and 16 years of age in Turkey. Pediatrics International. 2011;53(6):968-73.

87. Płudowski P, Kos-Kudła B, Walczak M, Fal A, Zozulińska-Ziółkiewicz D, Sieroszewski P, et al. Guidelines for Preventing and Treating Vitamin D Deficiency: A 2023 Update in Poland. Nutrients. 2023;15(3).

88. Pettifor JM, Prentice A. The role of vitamin D in paediatric bone health. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2011;25(4):573-84.

89. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. The Journal of clinical investigation. 2006;116(8):2062-72.

90. Del Valle HB, Yaktine AL, Taylor CL, Ross AC. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. 2011.

91. Sağlık Bakanlığı Bilim Kurulu Rehberi, Bebek ve Çocuklarda D Vitamini Ölçümü, Profilaksisi, D Vitamini Eksikliğinin Tanımlanması ve Tedavisi, Şubat 2018.

92. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. Nature reviews cancer. 2014;14(5):342

93. Giustina A, Adler RA, Binkley N, Bollerslev J, Bouillon R, Dawson-Hughes B, et al. Consensus statement from 2 nd International Conference on Controversies in Vitamin D. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. 2020;21:89-116.

94. Gasic V, Zukic B, Stankovic B, Janic D, Dokmanovic L, Lazic J, et al. Pharmacogenomic markers of glucocorticoid response in the initial phase of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. Radiol Oncol. 2018;52(3):296-306.

8. EKLER

8.1. Bilgilendirme ve Onam Formu

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın…….

“Akut lösemili hastalardan tanı sırasında alınan blast hücrelerinin canlılıkları üzerine B12 vitamini ve D vitamininin etkileri” başlıklı deneysel çalışma, yeni Akut Lösemi(AL) tanısı alan 0 -18 yaş grubu çocukların kanserli hücrelerinin besi yerine ekimini yaparak, hücrelerin Vitamin B12 ve Vitamin D içeren besi yerlerindeki yaşamını izlemektir. Çalışma sonucunda, yeni AL tanısı alan hastalarda vitamin eksikliği olması durumunda vitamin replasman tedavi zamanının doğru planlanması hedeflenmektedir. Kemik iliği aspirasyonu yapıldığı zaman çocuğunuzdan 2 cc ilik kanı alınacaktır. Yapılacak olan araştırma çocuğunuz açısından herhangi bir risk içermemektedir. Araştırma sonunda elde edilen bilgiler ile AL hastası çocuklara ek vitamin tedavilerinin düzenlenmesi konusunda daha fazla bilgiye sahip olunacaktır.
Araştırmaya katılım gönüllülük esasına göre olmaktadır, araştırmaya katılmama hakkına sahipsiniz. Araştırmaya katılmamanız durumunda çocuğunuzun tanı ve tedavisinde herhangi bir aksama meydana gelmeyecektir. Araştırmada yapılacak uygulamalar için sizden ekstra bir ücret talep edilmeyecektir. Çocuğunuzdan alınacak olan kan yalnızca bu araştırma için ve bilimsel amaçlarla kullanılacaktır ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır.
Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.
Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalamış bulunduğum bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.
Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)