

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RATLARDA L-ASPARAGİNAZ İLE DENEYSEL
OLARAK OLUŞTURULMUŞ KARACİĞER VE
PANKREAS TOKSİSİTESİNDE N-ASETİLSİSTEİN'İN
ETKİSİ**

Dr. Güzde Nur YURTTAŞ

**Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR
2019**

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RATLARDA L-ASPARAGİNAZ İLE DENEYSEL
OLARAK OLUŞTURULMUŞ KARACİĞER VE
PANKREAS TOKSİSİTESİNDE N-ASETİLSİSTEİN'İN
ETKİSİ**

Dr. Güzde Nur YURTTAŞ

**Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŐMANI
Doç. Dr. Zeynep Canan ÖZDEMİR**

**ESKİŞEHİR
2019**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA**

Dr. Gözde Nur Yurttaş'a ait "Ratlarda L-asparaginaz ile Deneysel Olarak Oluşturulmuş Karaciğer ve Pankreas Toksisitesinde N-Asetilsistein'in Etkisi" adlı çalışma, jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Özcan BÖR Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Üye	Doç. Dr. Zeynep Canan ÖZDEMİR Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Üye	Doç. Dr. Melike Sezgin EVİM Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun
Tarih ve Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ali ARSLANTAŞ
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, tezimin her aşamasında büyük emek ve katkılarıyla bana yardımcı olan tez danışman hocam Doç. Dr. Zeynep Canan ÖZDEMİR'e, tez hazırlık aşamasındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Özcan BÖR'e teşekkür ederim. Tezimin aşamalarının gerçekleşmesinde desteklerini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji, Histoloji-Embriyoloji ve Biyokimya Anabilim Dallar'ına teşekkür ederim.

ÖZET

Yurttaş, G.N. Ratlarda L-asparaginaz ile Deneysel Olarak Oluşturulmuş Karaciğer ve Pankreas Toksisitesinde N-Asetilsistein'in Etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2019. L-asparaginaz (L-ASP), akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılan çoklu ilaç tedavisinin bileşenidir. L-ASP ilişkili pankreatit sıklığının %2-18, hepatik toksisite sıklığının %30-60 arasında olduğu bildirilmektedir. Bu toksik etkilerin oluşum mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada L-ASP ilişkili karaciğer ve pankreas toksisitesinin oluşumunda oksidatif hasarın rolü ve N-Asetilsistein'in (NAC) doku hasarı üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 40 adet "Wistar-albino" türü erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar dört gruba ayrıldı. 1. gruba intraperitoneal (İP) olarak beş gün boyunca 0,02 ml/gr, serum fizyolojik; 2. gruba İP, 5 gün, 200 mg/kg/gün, NAC; 3. gruba İP 10.000 U/kg, tek doz L-ASP; 4. gruba İP 10.000 U/kg tek doz L-ASP verildikten 24 saat sonra başlanmak üzere beş gün, 200 mg/kg/gün NAC verildi. İntrakardiyak yöntemle alınan kan örneklerinden glukoz, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), total bilirubin (TB), direkt bilirubin (DB), alkalen fosfataz (ALP), trigliserit (TG), kolesterol, amilaz, lipaz çalışıldı. Histolojik inceleme için karaciğer ve pankreas dokusu alındı. Karaciğer için nekrotik hücre, sinüzoidal dilatasyon, hücresel infiltrasyon, konjesyon; pankreas için asiner hücre hasarı, adacık hücre hasarı, hücresel infiltrasyon ve konjesyon ve ödem bulgularına göre skorlama yapıldı. Kalan doku örneklerinden oksidatif stres parametreleri (malondialdehit, glutatyon, katalaz) çalışıldı. Gruplar arasında biyokimyasal parametreler, karaciğer ve pankreastaki oksidatif stres parametreleri açısından farklılık saptanmadı ($p>0,05$, hepsi için). Mikroskopik incelemede karaciğer ve pankreas doku hasarı skorlarının dağılımı açısından anlamlı farklılık bulundu. L-ASP grubundaki hayvanların hepsinde orta ve şiddetli düzeyde hasar olduğu, L-ASP+NAC grubunda ise hiçbir hayvanda şiddetli hasar oluşmadığı ve histolojik değişikliklerin normale yakın olduğu gözlemlendi ($p<0,01$, hepsi için). L-ASP'nin karaciğer ve pankreas toksisitesi üzerinde oksidatif stresin rolünü gösterilemedi, ancak NAC'nin dokudaki hasarı önemli ölçüde azalttığı gösterildi.

Anahtar Kelimeler: L-asparaginaz, karaciğer, pankreas, oksidatif stres, N-asetilsistein

ABSTRACT

Yurttaş, G.N. Effect of N-Acetylcysteine on Experimentally Induced Liver and Pancreatic Toxicity by L-asparaginase in Rats. Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Department of Pediatrics Master Thesis, Eskişehir, 2019. L-asparaginase (L-ASP) is a component of multidrug regimen of acute lymphoblastic leukemia. Incidences between 2-18% and 30-60% have been reported for L-ASP associated pancreatitis and hepatotoxicity respectively. Mechanisms of these toxic effects are not completely understood. Role of oxidative damage in L-ASP associated liver and pancreas toxicity and effect of N-acetylcysteine (NAC) on tissue damage is investigated in this study. 40 male *Wistar-albino* rats were used for the study. Rats were divided into four groups. First group received 0.02 ml/g of intraperitoneal (IP) saline for 5 days; second group received 200 mg/kg/day of IP NAC for 5 days; third group received 10,000 U/kg of a single dose L-ASP; fourth group received 200 mg/kg/day of IP NAC for 5 days, starting 24 hours after receiving 10,000 U/kg of a single dose L-ASP. Glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanin aminotransferase (ALT), total bilirubin (TB), direct bilirubin (DB), alkaline phosphatase (ALP), triglyceride (TG), cholesterol, amylase and lipase levels were measured from blood obtained via intracardiac route. Liver and pancreas tissues were extracted for histological evaluation. A scoring was done according to findings of necrotic cells, sinusoidal dilation, cellular infiltration and congestion for the liver, and acinar cell damage, islet cell damage, cellular infiltration, congestion and edema for the pancreas. Oxidative stress parameters (malonaldehyde, glutathione, catalase) were measured with the remaining tissue samples. No difference between any group was detected between biochemical parameters or liver and pancreas oxidative stress parameters ($p > 0.05$ for all). Significant difference was found between liver and pancreas tissue damage scores in microscopic evaluation. In the L-ASP group, all rats had moderate to severe damage while L-ASP+NAC group had no severe tissue damage and nearly normal histologic structure ($p < 0.01$ for all). Role of oxidative stress on liver and pancreas toxicity via L-ASP could not be demonstrated in our study, however, it is shown that NAC has significantly reduced tissue damage.

Key Words: L-asparaginase, liver, pancreas, oxidative stress, N-acetylcysteine

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Akut Lenfoblastik Lösemi	5
2.1.1. Epidemiyoloji	5
2.1.2. Genetik	6
2.1.3. PatogeneZ	7
2.1.4. Morfolojik Sınıflandırma	8
2.1.5. Klinik	12
2.1.6. Laboratuvar Bulguları	13
2.1.7. Tedavi	14
2.2. L-asparaginaz	19
2.3. Antioksidan Sistem	23
2.3.1. N-asetilsistein (NAC)	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onayı	28
3.2. Deney Hayvanları	28

3.3. Çalışma Grupları	28
3.4. Cerrahi İşlem ve Örneklerin Alınması	29
3.5. Biyokimyasal Değerlendirme	29
3.6. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi	30
3.7. Histopatolojik Değerlendirme	32
3.8. İstatistiksel Yöntem	33
4. BULGULAR	34
4.1. Sıçanların Karakteristik Özellikleri	34
4.2. Biyokimyasal Analizler	34
4.3. Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi	35
4.4. Histopatolojik İncelemeler	36
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
Allo-SCT	Allojenik kök hücre nakli
ALT	Alanin aminotransferaz
ALP	Alkaleen fosfataz
AML	Akut miyeloblastik lösemi
AST	Aspartat aminotransferaz
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CALGB 8811	Kanser ve Lösemi Grubu B 8811
c-ALL	Common akut lenfoblastik lösemi
CALLA	Ortak lösemi ilişkili antijen
CAT	Katalaz
CCG	Çocuk Kanser Grubu
COG	Çocuk Onkoloji Grubu
DB	Direkt bilirubin
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFS	Olaysız sağ kalım
FAB	French-American-British
GGT	Gama glutamil transferaz
GSH	Glutasyon; redükte glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside glutasyon
GSSG-R	Glutasyon redüktaz
HCVAD	Hiper-Siklofosamid, Vinkristin, Adriamisin ve Deksametazon
HLA	İnsan lökosit antijeni
IL	İnterlökin
İP	İntraperitoneal
KLL	Kronik lenfoblastik lösemi

KML	Kronik miyeloblastik lösemi
L-ASP	L-asparaginaz alan grup
L-ASP+NAC grubu	L-asparaginaz sonrası N-asetilsistein alan grup
MDA	Malondialdehit
MRD	Minimal kalıntı hastalık
NAC	N-asetilsistein
NAC grubu	N-asetilsistein alan grup
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü
PEG	Polietilen Glikol
POG	Pediyatrik Onkoloji Grubu
Pre-B ALL	B hücre öncüsü akut lenfoblastik lösemi
Pro-B ALL	Çok immatür B hücre öncüsü akut lenfoblastik lösemi
SOD	Süperoksit dismutaz
SSS	Santral sinir sistemi
T-ALL	T hücre öncüsü akut lenfoblastik lösemi
TB	Total bilirubin
TG	Trigliserit
TİCAM	Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi
VTE	Venöz tromboemboli
6-MP	6-merkaptopurin
6-TG	6-tiyoguanin

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
2.1. B Hücre Ontogenisi	10
2.2. T Hücre Ontogenisi	10
2.3. L-asparaginaz reaksiyonlarının şematik gösterimi	19
2.4. Antioksidan enzimlerin şematik görünümü	25
3.1. Enzim aktivitesi formülü	31
4.1. Çalışma ve kontrol grubunun dağılımı	34
4.2. Karaciğer dokusunda hasar skoru puan ortalaması	38
4.3. Kontrol grubunun karaciğer kesitleri	38
4.4. NAC grubunun karaciğer kesitleri	39
4.5. L-ASP grubunun karaciğer kesitleri	39
4.6. L-ASP+NAC grubunun karaciğer kesitleri	40
4.7. Pankreas dokusunda hasar skoru puan ortalaması	42
4.8. Kontrol grubunun pankreas kesitleri	42
4.9. NAC grubunun pankreas kesitleri	43
4.10. L-ASP grubunun pankreas kesitleri	43
4.11. L-ASP+NAC grubunun pankreas kesitleri	44

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
2.1. Akut lenfoblastik lösemilerin Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflandırılmasına göre sitolojik özellikleri ve morfolojik tipleri	9
2.2. ALL Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması	11
3.1. Malondialdehit ölçümü deney prosedürü	30
3.2. Glutasyon ölçümü deney prosedürü	31
3.3. Katalaz ölçümü deney prosedürü	32
4.1. Çalışma ve kontrol gruplarının laboratuvar parametreleri	35
4.2. Çalışma ve kontrol gruplarının karaciğer dokusundaki MDA, GSH, CAT düzeyleri	35
4.3. Çalışma ve kontrol gruplarının pankreas dokusundaki MDA, GSH, CAT düzeyleri	36
4.4. Gruplar arasında karaciğer doku hasarı skorlarının karşılaştırması	37
4.5. Gruplar arasında pankreas doku hasarı skorlarının karşılaştırması	41

1. GİRİŞ

Lösemi, kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerin klonal proliferasyonudur (1). Çocukluk çağı lösemilerinin %97'si akut lösemiler, akut lösemilerin yaklaşık %80'ini ise akut lenfoblastik lösemiler (ALL) oluşturur (2, 3). ALL, biyolojik olarak heterojen bir hastalıktır. Bu nedenle tanı koymak ve alt tiplerini sınıflandırmak için lösemik lenfoblastlarının morfolojik, immünolojik, sitogenetik, biyokimyasal ve moleküler genetik özelliklerinin tanımlanması gerekir (4). Etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Benzene maruz kalma, iyonlaştırıcı radyasyon, kemoterapi veya radyoterapiye maruz kalma gibi nedenlerin etiyolojide rol oynadığı düşünülmektedir (5). Asemptomatik bir çocuğun rutin kan sayımında tesadüfen ortaya çıkabileceği gibi hayati tehlike yaratan kanama problemi ve tekrarlayan enfeksiyon atakları ile ortaya çıkabilir (3).

ALL, Afrika ve Orta Doğu hariç tüm dünyada 20 yaş altındaki çocuklar arasında en yaygın malignitedir (6, 7). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD), tüm çocuk hastalar göz önünde bulundurulduğunda, çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık %25'inden, lösemilerin %79,5'undan, lenfositik lösemilerin %99'undan sorumludur (7). Ülkemizde 2002-2008 yılları arasında yapılan araştırmada çocukluk çağı kanserlerinin %31,3'ünü lösemilerin, lösemilerin %79,8'ini ise lenfoblastik lösemilerin oluşturduğu belirlenmiştir. 2009-2016 verilerine göre ise tüm kanserlerin %28,6'sını lösemiler oluşturmaktadır (8, 9).

Son 50 yılda, ALL'li çocukların prognozunda çarpıcı şekilde bir iyileşme olduğu dikkat çekmektedir (3). ALL'de ilk remisyona 1947'de Farber ve arkadaşları tarafından sağlanmış, sağkalımın tanı anından itibaren 2 ay olduğu bildirilmiştir (10). Klinik sonuçlar, çok ajanlı tedavilerin gelişimi, iyi tasarlanmış protokoller ve tedavi rejimlerine L-asparaginaz'ın (L-ASP) girilmesiyle çarpıcı şekilde iyileşmiştir. Günümüzde ALL tedavisinde kullanılan tedavi rejimleri ile hastaların %95'inden fazlası tam remisyona ulaşmakta olup olaysız sağkalım oranı %85'lere ulaşmış durumdadır (11, 12).

L-ASP, ALL tedavi protokollerinin temel taşıdır. Tüm pediatrik ve yetişkin tedavi protokollerinin çoğunda indüksiyon ve remisyonun yoğunlaştırılması tedavilerinde kullanılmaktadır (13). L-ASP'ın, çoğu antineoplastik ajanın miyelosupresif etkilerinden bağımsız olarak karaciğer, pankreas, böbrekler, dolaşım

sistemi ve beyin dahil olmak üzere diğer organlar üzerinde geniş bir toksik etkisinin olduğu bilinmektedir (14). Bugüne kadar *Escherichia coli*'den (*E. coli*) türetilen doğal asparaginaz (*E. coli* asparaginaz); bu enzimin pegile edilmiş bir formu olan (PEG-ASP); ve *Erwinia chrysanthemi*'den izole edilen Erwinia ASP olmak üzere üç asparaginaz preparatı mevcuttur (15). Bu ürünler dışında, yeni bir dördüncü rekombinant *E. coli* L-ASP preparatının klinik çalışmaları yapılmıştır. Veriler rekombinant *E. coli* L-ASP preparatının diğer *E. coli* asparaginazlara benzer bir etkinlik ve toksisite profilini gösterdiğini ortaya koymuştur (16). L-ASP tedavisi sırasındaki advers etkilerin çoğu, karaciğer ve pankreastaki geçici protein inhibisyonu ile ilgilidir (17). L-ASP'ın neden olduğu hepatotoksisite en sık transaminazlarda ve bilirubinde asemptomatik artışlar ve fibrinojende azalma olarak ortaya çıkar, ancak karaciğerin steatozuna da neden olabilir (18). ALL için çoklu ajan tedavisinin bir parçası olarak asparaginaz alan hastaların %30-60'ında yüksek hepatik transaminaz, alkalik fosfataz ve bilirubin düzeyleri bildirilmiştir. Asparaginaz kullanımı, hipertrigliseridemi de dahil olmak üzere lipid metabolizmasında bir dizi anormallik ile de ilişkilidir. Asparaginaz ve kortikosteroidlerle kombine tedavi, ALL tedavisi alan hastaların yaklaşık %67'sinde hipertrigliseridemiye yol açmaktadır. Hipertrigliseridemi geçici bir durumdur ve hastalar asemptomatiktir. Tedavi dozunda ayarlamalar genellikle gerekli değildir; bununla birlikte, yüksek trigliserit seviyesine sahip hastalar pankreatit belirtileri açısından yakından izlenmelidir (19). Pankreatit tablosu hafif, asemptomatik bir kimyasal pankreatitten, asparaginaz ürünlerinin kalıcı olarak kesilmesine yol açan semptomatik bir pankreatit tablosuna kadar değişebilir (18). Klinik çalışmalarda, ALL için asparaginaz tedavisi alan hastaların %2-18'inde pankreatit olduğu bildirilmiştir (19).

Reaktif oksijen türleri (ROS/serbest radikaller) normal hücresel metabolizma sonucu canlı organizmalar tarafından üretilir. Düşük ile orta derecedeki konsantrasyonlarda, fizyolojik hücre işlemlerinde işlev görürler, ancak yüksek konsantrasyonlarda karbonhidratlar, nükleik asitler, lipidler ve proteinler gibi hücre yapılarına zarar verebilir ve fonksiyonlarını değiştirebilirler. Lipidler, proteinler ve deoksiribo nükleik asit (DNA) gibi hücre bileşenlerinde olumsuz değişiklikler yaparlar (20, 21). ROS, hücrede birçok mekanizma ile üretilirken çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar tarafından hızla detoksifiye edilir. Ancak, oksidan-antioksidan

dengesinin bozulması oksidatif strese ve hücre hasarına neden olur (22). Kemoterapinin neden olduğu oksidatif stresin kanserli hastalarda yan etkilere neden olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar antikanser ilaçların kanser hücrelerinde oksidatif stres yaratıp yaratmadığını incelemiş ve aralarında bağlantı olduğunu bulmuşlardır (22-25). Enzimatik ve enzimatik olmayan korunma mekanizması gerek serbest radikal üretimini engelleyerek gerekse oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırarak etki göstermektedirler. Memeli hücrelerinde, enzimatik savunma sistemi esas olarak süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktazdan (GSSG-R) oluşur (26, 27). Enzimatik olmayan antioksidanlar ise vitaminler (C ve E vitaminleri), b-karoten, glutatyon (GSH), sistein ve ürik asit gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşikler içerir (28).

N-asetil sistein (NAC), mukolitik bir ajan olup L-sistein ve indirgenmiş glutatyonun ön maddesidir ve etkili bir antioksidan olan glutatyonun oluşumunda rol oynar. Ayrıca NAC'ın doğrudan oksidanları temizlediği, özellikle hidroksil radikali ve hipokloröz asiti azalttığı gösterilmiştir. Bu yüzden ROS oluşmasından kaynaklanan farklı bozukluklar için potansiyel bir tedavi seçeneği olarak önerilmektedir (29).

Bu çalışmada, sıçanlarda L-ASP ile deneysel olarak oluşturulan karaciğer ve pankreas hasarında oksidatif stresin rolü ve NAC'ın meydana gelen patolojik değişiklikler üzerine tedavi edici etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kanserin ilk yazılı tanımı milattan önce 1600'lü yıllarda Mısır'a kadar uzanırken, lösemili bir hastaya ait ilk rapor 1827'de görülmüştür (30). Fransız doktor Alfred Armand Louis Marie Velpeau, ateş ve halsizlikten şikayetçi Monsieur Vernis isimli 63 yaşında erkek üzerinde yaptığı otopsi sonucunda karaciğer ve dalağın büyük olduğunu, kanın “yulaf lapası” benzeri bir kıvama sahip olduğunu belirtmiştir (31). Jan Swammerdam ve Joseph Lieutaud, sırasıyla 1658 ve 1749'da kırmızı hücreleri ve beyaz hücreleri tanımlayan ilk kişiler olup yaklaşık 20 yıl sonra, William Hewson lenfosit ve lenf sistemini tarif etmiştir (30, 32). John Hughes Bennett 1845 yılında kanda gözlemlendiği değişimin iltihaptan bağımsız olduğunu, bu dönüşümün sistem boyunca gerçekleştiği sonucuna varmış ve hücrelerin çizimlerini yayınlamıştır. Bu çizimler lösemili bir hastanın kan hücrelerinin ilk illüstrasyonlarıdır. Rudolf Virchow, 1847'de “lösemi” terimini kullanmış, Henry Fuller, 1850'de, dokuz yaşındaki bir kız çocuğunda, kanın mikroskopik incelemesiyle lösemiye teşhis eden ilk kişi olmuştur. 1856 yılında Virchow lösemiye lenfositozdan ayırmış ve bugün hala hastalığın anlaşılmasında esas olan hücresel kökenleri ile ilgili teorisini öne sürmüştür (30). Ernst Neumann ilk olarak 1868'de, lösemide kemik iliği değişikliklerini bildirmiş ve 1872'de lösemnin kemik iliği hastalığı olduğu sonucuna varmıştır ancak gözlemlerinin yaygın olarak kabul görmesi için 20 yıl geçmesi gerekmiştir (30, 33). 1900'de miyeloblast ve lenfoblast tanımlanmış (30), 1913'e geldiğinde, lösemi; ALL, Akut Miyeloblastik Lösemi (AML), Kronik Lenfositik lösemi (KLL) ve Kronik Miyeloblastik Lösemi (KML) olarak sınıflandırılmıştır (33). Daha sonraki yıllarda hastalıkla ilgili birçok çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalar günümüzde halen devam etmektedir.

Lösemi, hematopoetik kök hücrelerinin malignitesidir. Matür ya da immatür hücrelerin kemik iliğinde kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla ortaya çıkar. Akut lösemiler aniden ortaya çıkıp, hızlı ilerlerken, kronik lösemiler yavaş ilerler ve yıllar sonra ortaya çıkarlar, ayrıca hastalığı oluşturan öncül hücrelerin tipine göre lenfoid ve miyeloid olarak adlandırılırlar (34). Çocukluk çağı lösemilerinin %97'si akut lösemilerdir (2). Ekim 1974'te Fransız, Amerikalı ve İngiliz hematologdan oluşan yedi kişilik bir grup (FAB) 150 akut lösemili olgunun periferik kan ve kemik iliğini incelemiş, büyüklüğü, çekirdek şekli, çekirdekçik sayısı, stoplazmalarının bazofili derecesini esas alarak 1976 yılında FAB sınıflandırmasını yayınlamıştır (35). Bu

sınıflandırmaya göre ALL; ALL-L1, L2, L3 olmak üzere üç, AML de AML-M0'dan M6'ya kadar olmak üzere yedi alt gruba ayrılmıştır (35). 1985 yılında Bennett ve arkadaşları tarafından FAB miyeloblastik lösemi sınıflandırılması modifiye edilmiş ve M7 alt grubu eklenmiştir (36).

2.1. Akut Lenfoblastik Lösemi

2.1.1. Epidemiyoloji

ALL, olgunlaşmamış lenfoid hücrelerin kemik iliği, kan ve diğer organlarda monoklonal proliferasyonu ile giden heterojen bir hastalık grubudur (37). Çocuklarda en sık görülen kanser türüdür. Doğumdan yetişkinliğe kadar her yaşta ortaya çıkar ancak en sık görüldüğü dönem 2 ile 5 yaş arasındadır (4, 38). İnsidans erkeklerde kızlara göre daha yüksektir ve bu fark puberte döneminde daha belirgindir (4). ALL'nin insidansı 15 yaşından küçük çocuklar için 3-4/100.000'dir (39, 40). Her yıl yaklaşık olarak ABD'de 3.000, Avrupa'da 5.000 çocuk ALL tanısı almaktadır (4). On beş yaşından küçük çocuklarda tüm kanser türlerinin yaklaşık olarak %25'ini, tüm lösemilerin %72'sini oluşturur (38, 40). Ülkemizde 2002-2008 yılları arasında yapılan araştırmada çocukluk çağı kanserlerinin %31,33'ünün lösemiler, lösemilerin %79,81'inin ise lenfoblastik lösemiler olduğu görülmüştür. 2009-2016 verilerinde ise tüm kanserlerin %28,6'sını lösemiler oluşturmaktadır (8, 9).

Çocukluk çağı ALL'sinin 2-5 yaş arasında pik yapmasının nedeni enfeksiyon temeline dayanan iki ayrı hipotez ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bunlardan birisi Kinlen'in popülasyon-karıştırma hipotezi, diğeri ise Greaves'in gecikmiş-enfeksiyon hipotezidir. Kinlen'in hipotezine göre; ALL'nin 2-5 yaş arasında pik yapmasının sebebi sık görülen fakat patolojik olmayan enfeksiyonların taşıyıcılarıyla, o enfeksiyona karşı bağışık olmayan bireylerin popülasyonunun karıştırılması ile açıklanmaktadır (6, 41). Greaves'in gecikmiş-enfeksiyon hipotezi, en az iki vuruşlu bir modele dayanmaktadır. Prenatal olarak edinilmiş bir prelösemik klonu olan bazı duyarlı bireyler eğer hijyenik bir ortamda yaşıyorlarsa sık görülen enfeksiyonlar ile yaşamın erken dönemlerinde maruz kalma oranları düşük veya hiç olmamaktadır. Artmış lenfoid hücre çoğalmasına uygun yaş döneminde, sık görülen enfeksiyon ajanlarıyla maruziyetin gecikmesi, bu bireylerin immün sisteminin anormal veya patolojik tepkiler vermesine sebep olmaktadır (41).

2.1.2. Genetik

Kanserin (onkogenez) gelişimi, hücre büyümesini ve programlanmış hücre ölümünü düzenleyen genlerin bir veya daha fazlasındaki mutasyonlardan kaynaklanır (42). Bir blast hücresinin lösemik klonla dönüşmesi için olasılıkla genomdaki bir veya birkaç değişikliğin olması gerekmektedir (43). Bu genler; proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleri olmak üzere üç gruba ayrılır (44).

1) Proto-onkogenler: Normal hücre bölünmesini ve farklılaşmasını sağlayan proteinleri üretirler. Bu genlerin mutasyona uğramış formları onkogenler olarak adlandırılır. Bir proto-onkogenin bir onkogene dönüşümü, proto-onkogenin mutasyonu, proto-onkogeni yeni bir konuma taşıyan kromozomdaki genlerin yeniden düzenlenmesiyle veya normal proto-onkogenlerin kopya sayısındaki artışla meydana gelebilir. Bazen bir virüs, DNA'sını, proto-onkogenin içine veya yakınına ekleyerek onkogene dönüşmesine neden olur. Onkogenler, sinyalizasyon kaskadını sürekli olarak harekete geçirerek, büyümeyi uyaran faktörlerin artmasına neden olur. Çoğu onkogenler dominant mutasyonlardır (44).

2) Tümör baskılayıcı genler: Hücre bölünmesini önleyen veya hücre ölümüne neden olan proteinleri üretirler. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar genin fonksiyonunu kaybetmesine neden olur. Sonuçta hücre büyüme ve bölünmesi inhibe edilemez hale gelir. Tümör baskılayıcı genleri içeren kanserler genellikle kalıtsaldır (44).

3) DNA tamir genleri: Kansere ilişkili üçüncü bir gen tipi, DNA onarımında ve kromozom yapısının korunmasında rol oynayan genlerdir. İyonlaştırıcı radyasyon, ultraviyole ışığı ve kimyasallar gibi çevresel faktörler DNA'ya zarar verebilir. DNA replikasyonundaki hatalar da mutasyonlara yol açabilir. DNA tamir genlerinin ürünleri kromozom hasarını onarır, böylece hücre içindeki mutasyonları en aza indirir. Bir DNA onarım geni mutasyona uğradığında ürün artık üretilmez, DNA onarımı önlenir ve hücre içinde daha fazla mutasyon oluşur (44).

Kontrollü hücre büyümesi; büyümeyi hızlandıran proto-onkogenlerin ve hücre büyümesini yavaşlatan tümör baskılayıcı genlerin düzenlenmesiyle korunur. Onkogen üreten mutasyonlar büyümeyi hızlandırırken, tümör baskılayıcı genleri etkileyen mutasyonlar normal hücre büyümesini inhibe olmasını engeller. Sonuçta kontrolsüz hücre büyümesi gerçekleşir (44).

ALL'nin gelişmesine yol açan patojenik olaylar tam olarak bilinmemektedir (45). Tümör gelişiminden kromozom anomalileri sorumlu tutulmuştur (46). KML patogenezinde önemli rol oynayan Philadelphia kromozomunun, mixed lineage lösemide (MLL) t(12;21) [ETV6-RUNX1], t(1;19) [TCF3-PBX1] geninin yeniden düzenlenmesinin önemi keşfedildikten sonra, kromozomal bozuklukların ALL gelişiminde çok önemli rol oynadığı anlaşılmıştır (45). Ancak kromozomal değişiklikler tek başına lösemi oluşturmak için yeterli değildir. Çocukluk çağı lösemilerinin dörtte birinde kromozomal değişiklik bulunmamaktadır ve bu vakalardaki hastalığın genetik temeli yeterince anlaşılmamıştır (47).

2.1.3. Patogenez

Pediyatrik ALL gelişiminde potansiyel patojenik mekanizmalarla ilgili çeşitli hipotezler tanımlanmış olmasına rağmen, halen etiolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır (48). Sadece bazı vakalarda Down sendromu, Bloom sendromu, ataksi-telanjektazi ve Nijmegen Kırık sendromu gibi kalıtsal hastalıkların, radyasyon veya bortezomib, talidomid, lenalidomid, doksorubisin gibi spesifik kemoterapötik ilaçlara maruz kalmanın predispozan nedenler olduğu bildirilmiştir (45, 49-52).

İyonlaştırıcı radyasyona akut maruziyet, özellikle AML olmak üzere lösemi riskinde gözlenen artışlarla etiyojik olarak bağlantılı bulunmuştur (53-55). Riskin büyüklüğü; radyasyon dozu, maruziyetin süresi ve maruz kalma sırasında bireyin yaşı ile ilişkilidir (56). Gebelik öncesi radyasyona maruziyetin çocukluk çağı lösemi riskini artırdığı gösterilmiştir (57, 58). Non-iyonize elektromanyetik alanlara maruziyet ile çocukluk çağı lösemisi arasında bir ilişkinin var olup olmadığını belirlemek için çok sayıda epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Çalışmalardan bazılarında az sayıda hastada bu ilişkinin var olduğu gösterilmiş, (59, 60) bazılarında ise hiçbir ilişki gösterilememiştir (61, 62).

Çocukluk çağı lösemisi ile en çok ilişkilendirilen kimyasal maddeler hidrokarbon bileşikleri (benzin, leke çıkarıcı) ve böcek ilaçlarıdır (56). Epidemiyolojik çalışmanın birinde, paternal hidrokarbon maruziyetinin, bir yaş altındaki çocuklarda hem AML hem de ALL ile ilişkili olduğu gösterilmiştir, ancak bu bulgu, daha geniş bir yaş aralığını kapsayan diğer çalışmalarla doğrulanamamıştır (63). Bazı çalışmalar, pestisitlere maruz kalan fetüslerin ve çocukların yetişkinlere kıyasla kanser için daha

yüksek risk altında olduğunu göstermektedir (64, 65). Doğumdan bir yıl öncesinden üç yaş sonrasına kadar herhangi bir zamanda profesyonel haşere kontrol hizmetlerine maruz kalan çocuklarda riskin arttığı bulunmuştur (66). Fransa’da yapılan bir vaka-kontrol çalışmasında, ilk kez, insektisidal pedikülozlu şampuan tedavisinin, çocukluk ALL ve AML ile ilişkili olduğu bulunmuştur (67).

Maternal alkol tüketiminin çocukluk çağı lösemi gelişme riski üzerine etkisi incelendiğinde AML için riskin ALL'nin neredeyse iki katı olduğu görülmüştür (68). Hamilelik öncesi veya hamilelik sırasında anne ya da baba sigara içiminin çocukluk çağı lösemi gelişimi için bir risk faktörü olup olmadığı net değildir (69). Hamilelik öncesi ve hamilelik sırasında annenin esrar kullanımı, çocukluk dönemi AML ve ALL ile ilişkilendirilmiştir (70).

Bazı gözlemler, bulaşıcı infeksiyonların çocukluk çağı lösemisinin onkogenik sürecine potansiyel olarak dahil olduğu teorisine katkıda bulunmaktadır (56). Çocukluk çağı lösemisi, daha sıklıkla bağışıklık sistemi gelişiminin en az olduğu 2-5 yaş arasında gelişir (71). Ek olarak, bazı insan kanserlerinde viral etiyoloji gösterilmiştir (72).

2.1.4. Morfolojik Sınıflandırma

ALL, biyolojik olarak heterojen bir hastalıktır. Bu nedenle, lösemik lenfoblastların morfolojik, immünolojik, sitogenetik, biyokimyasal ve moleküler genetik karakterizasyonları ALL alt tiplerini sınıflandırmak için gereklidir (4).

ALL, sıklıkla B hücresi öncülerinden (B-ALL) veya daha az sıklıkta T hücre öncülerinden (T-ALL) köken almaktadır. Her ikisi de, lösemi oluşumuna katkıda bulunan kromozomal değişikliklere sahip çoklu alt tipleri içerir (73).

a) Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) sınıflandırması:

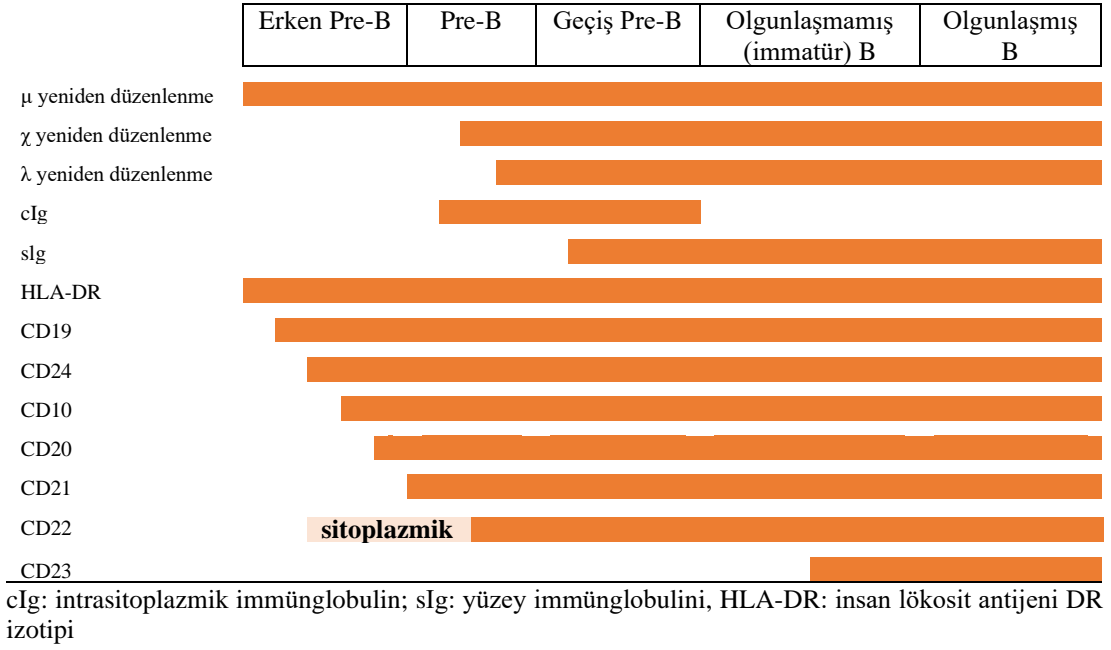
Bu sınıflamaya göre lösemiler, hücre büyüklüğü, sitoplazma, çekirdekçik, vakuolizasyon ve bazofili özellikleri dikkate alınarak dayanarak 3 alt tipe (L1, L2 ve L3) ayrılır (35) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Akut lenfoblastik lösemilerin Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflandırılmasına göre sitolojik özellikleri ve morfolojik tipleri (74)

L1: ALL'li çocukların %85'i	L2: ALL'li çocukların %14'ü	L3: ALL'li çocukların %1'i
<ul style="list-style-type: none"> • Hücre boyutu: küçük hücreler baskın • Nükleer kromatin: genellikle homojen • Nükleer şekil: düzenli; arada sırada çentikli veya girintili • Nükleol: Görünmez veya küçük ve göze çarpmayan • Sitoplazma: Yetersiz • Sitoplazmanın bazofili: Çok az • Sitoplazmik vakuolleşme: değişken 	<ul style="list-style-type: none"> • Hücre boyutu: boyut olarak değişken • Nükleer kromatin: değişken, heterojen • Nükleer şekil: düzensiz, yaygın çentikli ve girinti • Nükleol: bir veya daha fazla mevcut; genellikle büyük • Sitoplazma: değişken, genellikle orta derecede bol • Sitoplazmanın bazofili: değişken, bazen derin • Sitoplazmik vakuolleşme: değişken 	<ul style="list-style-type: none"> • Hücre boyutu: büyük homojen hücreler • Nükleer kromatin: ince kesimli ve homojen • Nükleer şekil: düzenli, ovalden yuvarlağa • Nükleol: belirgin, bir veya daha fazla veziküllü • Sitoplazma: orta derecede bol • Sitoplazmanın bazofili: çok derin • Sitoplazmik vakuolleşme: sıklıkla belirgin

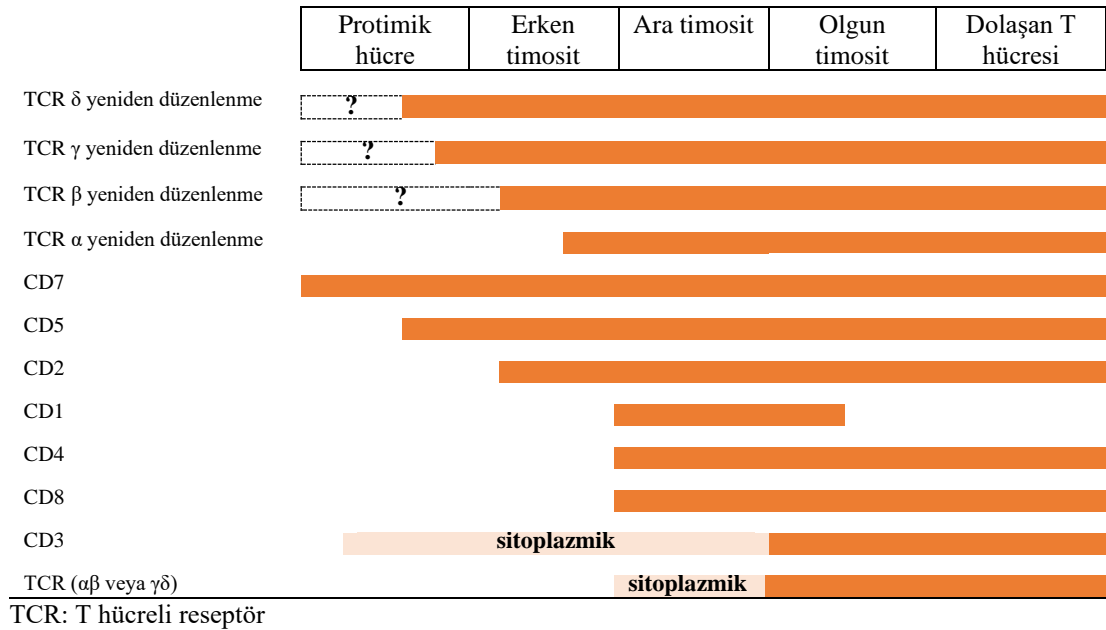
b) İmmünolojik sınıflandırma:

ALL'nin immünofenotipik alt tiplerinin tanımlanması 1970'li yıllarda başlamıştır. ALL'ler, hücre yüzeyinde ve lenfoblastların sitoplazmasında bulunan hücre türü ve maturasyon spesifik antijenlerin ekspresyonuna dayanarak alt tiplere ayrılmıştır (75). Normal B ve T hücre ontogenisi marker ekspresyonu ve gen yeniden düzenlemesinin varsayımsal şeması şekil 2.1 ve şekil 2.2'de gösterilmiştir (76).



Şekil 2.1. B Hücre Ontogenisi (76)

Çok immatür B hücresi öncüsünden türetilmiş olduğuna inanılan pro-B hücreli ALL, CD10-negatif immünfenotip ve cIg yokluğu ile karakterizedir. Erken pre-B hücresinin, pro-B hücresinden daha olgun bir B hücre öncülünden türetildiği düşünülmektedir. Sitoplazmik immünglobulin içermeyen CD10-pozitif (ortak lösemi ilişkili antijen-CALLA) lösemilere de common ALL (c-ALL) adı verilir (3).



Şekil 2.2. T Hücre Ontogenisi (76)

Bazı durumlarda, lösemik hücreler aynı anda hem lenfoid hem de miyeloid yüzey antijenlerini açığa çıkartırlar (77). ALL vakalarının yaklaşık %20'sinde miyeloid antijenleri de bulunur (77). Miyeloid antijen, tanı sırasındaki genç yaş (<12 ay), pro-B immüfenotipi (CD10-) ve kromozom 11q23, Ph kromozomu [t(9;22)] ve ETV6-RUNX1 [t(12;21)] füzyonunun yeniden düzenlenmesi gibi bazı kromozomal anormallikler ile ilişkilidir (78-80).

c) Sitogenetik ve Moleküler Sınıflandırma:

1997'de Dünya Sağlık Örgütü, lösemik blastların morfolojik ve sitogenetik özelliklerine üç tipe ayırmıştır. Bunlar; B lenfoblastik, T lenfoblastik ve Burkitt hücreli lösemilerdir (81). Daha sonra 2008 yılında Burkitt hücreli lösemi, Burkitt lenfoma ile benzer özellikler gösterdiği için bu sınıflamadan kaldırılmıştır. ALL'ler B ve T lenfoblastik lösemiler olarak iki ana sınıfa, B lenfoblastik lösemiler ise başka şekilde tanımlanmamış B lenfoblastik lösemiler ve tekrarlayan genetik anormallikleri olan B lenfoblastik lösemiler olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmıştır (82). Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı ve 2008 yılında yenilenen sınıflama tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. ALL Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması (76)

B lenfoblastik lösemi

B lenfoblastik lösemi, başka şekilde tanımlanmamış

B lenfoblastik lösemi; tekrarlayan genetik anormallikler ile

B lenfoblastik lösemi; t(9;22) (q34;q11.2); BCR-ABL 1 ile

B lenfoblastik lösemi; t(v;11q23); MLL yeniden düzenlemesi ile

B-lenfoblastik lösemi; t(12;21) (p13;q22) TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) ile

B lenfoblastik lösemi; hiperdiploidi ile

B lenfoblastik lösemi; hipodiploidi ile

B lenfoblastik lösemi; t(5;14) (q31;q32) IL3-IgH ile

B lenfoblastik lösemi; t(1;19) (q23;p13.3); TCF3-PBX1 ile

T lenfoblastik lösemi

BCR: Breakpoint cluster region, ABL: Abelson Protoonkogeni, MLL: Mixed-lineage lösemi, AML1: akut miyeloid lösemi geni 1, ETV6: E twenty-six (ETS) variant geni 6, RUNX1: Runt-related transkripsiyon faktörü 1, IL3: İnterlökin 3, IgH: immünglobulin ağır zincir, TCF3: Transkripsiyon Faktörü 3, PBX1: pre-B hücreli lösemi transkripsiyon faktörü 1

2.1.5. Klinik

ALL, asemptomatik olan hastada rutin olarak yapılan kan sayımında tesadüfi olarak veya hayati tehlike yaratan kanama ve infeksiyon gibi olaylarla akut bir şekilde ortaya çıkabilir (3). Ateş, hastaların yaklaşık %60'ında görülür ve en yaygın bulgudur. Progresif kemik iliği yetmezliği solukluğa (anemi), kanamaya (trombositopeni) ve infeksiyonlara duyarlılığa (nötropeni) yol açar. Hastaların üçte birinden fazlasında, periost, kemik veya eklemde lösemik infiltrasyonuna ya da lösemi hücrelerinin kemik iliği kavitesinin genişletmesine bağlı olarak kemik ve eklem ağrıları gelişir. Lösemik hücrelerin infiltrasyonuna bağlı olarak lenfadenopati ve hepatosplenomegali gelişebilir (4).

Tanı anında santral sinir sistemi (SSS) tutulumu %5 oranında görülür. SSS tutulumu olan hastaların büyük çoğunluğu asemptomatiktir (3). Semptomatik hastalarda kusma, baş ağrısı, papil ödem ve uyuşukluk gibi kafa içi basınç artışına dair belirtiler, yaygın veya fokal nörolojik belirti ve semptomlar gösterebilirler (83). ALL nadiren spinal kordu sıkıştıran lokalize bir epidural lösemik infiltrasyon olarak da ortaya çıkabilir (84).

Timusun lösemik infiltrasyonu, akciğer grafisinde ön mediastende kitle olarak görünür. Yeni tanı alan hastaların yaklaşık %10'unda görülür ve neredeyse her zaman T hücresi immünofenotipi ile ilişkilidir. Mediastinal yapıların lösemik infiltrasyonu hayatı tehdit eden trakeobronşiyal veya kardiyovasküler kompresyona neden olabilir (3).

Testisküler ALL'nin klinik prezantasyonu, bir veya iki testisin de ağrısız büyümesidir. Klinik olarak saptanabilen testiküler lösemi %1-2 oranında görülür ve prognostik önemi yoktur (85, 86). Tanı sırasında gizli testiküler tutulum, özellikle yüksek tümör yükü varlığında daha sık görülür (3). Priapizm nadirdir ve genellikle yüksek beyaz küre sayısı ile ilişkilidir (87).

Eklem ağrısı ve şişmesi hastalığın belirtileri olabilir ancak başlangıçta tanıda karışıklığa neden olabilir (88). Şişlik ve hassasiyetle birlikte gelişen eklem ağrısı, juvenil romatoid artrit veya romatizmal ateş şeklinde yanlış tanı alabilir (88, 89). ALL'li çocukların %25'inde tanıda osteopeni ve kırık gibi (vertebra fraktürü kırıkları da dahil olmak üzere) karakteristik radyografik değişiklikler vardır (88, 90, 91).

Yeni tanı konmuş hastaların üçte birinden fazlasında lösemnin oftalmik belirtileri görülebilir (92). Lösemi hemen hemen tüm oküler yapıları tutabilir. En sık görülen oküler anormallik olan retina kanaması, muhtemelen trombositopeni veya anemiden kaynaklanır (93). Oküler motor palsiler ve papil ödem meningeal lösemnin göstergesidir ve nadiren optik sinirin lösemik infiltrasyonu ile ilişkili olabilir (94).

Yaygın intravasküler koagülopati, yeni tanı alan ALL hastalarında nadiren görülür (3). T lenfoblastlardan salınan tromboplastik maddelerin bir sonucu olarak T hücreli ALL'de daha yaygındır (95). Ayrıca pre-B hücre immünofenotipi ile ilişkili nadir görülen t(17; 19) translokasyonu olan hastalarda da rapor edilmiştir (96).

2.1.6. Laboratuvar Bulguları

Hastaların %75'inden fazlası genellikle normokromik, normositik olan ve normal/düşük retikülosit sayısı ile ilişkili anemi ile kendini gösterir. Periferik yaymada kemik iliği infiltrasyonuna uygun şekilde gözyaşı hücreleri ve çekirdekli eritrositler izlenebilir (3).

Tanıda lökositozun derecesi prognozun güçlü bir göstergesidir (4). Yüksek miktarda lökosit sayısında bile mutlak nötropeni ($<500/\text{mm}^3$) yaygın görülür ve ciddi infeksiyon riski ile ilişkilidir (3).

Trombositopeni ($<50.000/\text{mm}^3$) genellikle tanı sırasında mevcuttur ve izole trombositopeni lösemide nadir olduğu için immün trombositopeniden kolayca ayırt edilebilir. İnfeksiyon ve ateşin olmaması koşuluyla, trombosit sayısı $20.000/\text{mm}^3$ kadar düşük olsa bile şiddetli kanama nadirdir. Genellikle hafif olan koagülopatiyeye T hücreli ALL'de rastlanabilir ve nadiren şiddetli kanama ile ilişkilidir (4).

Pansitopeni nadir durumlarda ALL tanısından önce farkedilebilir ve aplastik anemiden ayrılmalıdır. T hücreli ALL hastalarında anemi veya trombositopeni genellikle hafiftir (4).

Hiperlökositoz ($>100.000/\text{mm}^3$) hastaların %10-15'inde görülür (4). Belirgin şekilde yükselmiş lökosit sayısı olan hastalarda, mikro dolaşımdaki kan akışı, deforme olabilen blastların intravasküler kümelenmesi yüzünden engellenebilir. Bu, özellikle santral sinir sistemi ve akciğerde lokal hipoksemi, endotel hasarı, kanama ve enfarktüs ile sonuçlanabilir (3). İntraserebral kanama veya solunum yetmezliği ile sonuçlanan

klirik olarak anlamlı lökostasis, AML hiperlökositozunda ALL'den daha yaygındır (97).

Genellikle reaktif olan hipereozinofili tanıda bulunabilir (98). Pre-B hücreli ALL'deki eozinofili, 5. kromozom üzerindeki IL-3 ve IgH genini içeren t(5;14)(q31;q32) translokasyonu ile ilişkilendirilmiştir (99, 100)

Blastik hücreler periferik kan incelemesinde bulunmayabilirler, varsa bile yanıltıcı olabilir. Bu yüzden lösemnin kesin teşhisi, periferik kanın morfolojik incelemesi ile yapılamaz (3). Lösemi tanısı için, kemik iliği aspirat sürüntülerinin incelenmesi esastır. Normal kemik iliğinde %5'ten daha az blast olduğu halde, lösemi iliği genellikle lösemik blastlar tarafından infiltre edilmiştir. İlik örneği genellikle hiperselüllerdir ve homojen hücre popülasyonu ile karakterizedir. Kemik iliğinde blast sayısı %5'ten büyük olan hastalarda lösemiden şüphelenilmelidir, ancak tanı, %25'ten daha az tek kemik iliği incelemesi temelinde konulmamalıdır (4). Bazen kemik iliği aspirasyonunun tanı anında elde edilmesi zor olabilir (3). Bu genellikle kemik iliğindeki blastların yoğunluğundan bazen de kemik enfarktüsü, fibroz veya nekrozdan kaynaklanabilir (101, 102). Bu gibi durumlarda, kemik iliği biyopsisi ile tanı konulabilir (3).

2.1.7. Tedavi

Geçtiğimiz 50 yıl boyunca, ALL tedavisindeki ilerlemeler, çocuklarda %80'in üzerinde uzun süreli olaysız sağkalım (EFS) oranlarına ulaşılmasını sağlamıştır (37). İyileştirmeler büyük ölçüde, hastalığın moleküler genetiği ve patogenezinin anlaşılmasında, riske uyarlanan tedavinin dahil edilmesinde ve yeni hedeflenen ajanların ortaya çıkmasında yaşanan gelişmelerden kaynaklanmaktadır (37, 103).

Terapinin risklerini ve yararlarını uygun şekilde dengelemek amacıyla benimsenen “riske uyarlanmış terapi”de EFS, klinik ve biyolojik değişkenlere dayanarak tahmin edilir ve tedavi yoğunluğu daha sonra tedaviyi en üst düzeye çıkarmak ve toksisiteyi en aza indirmek için beklenen EFS'ye göre modifiye edilir (104, 105)

Pediyatrik çalışma grupları, uzun yıllar boyunca, risk kategorilerini tanımlarken farklı prognostik faktörler kullanmışlardır. Pediyatrik Onkoloji Grubu (POG) ve Çocuk Kanseri Grubu (CCG), 1993 yılında Ulusal Kanseri Enstitüsü (NCI) tarafından

desteklenen uluslararası bir konferansta ortak risk kriterlerini belirlemiştir (106). NCI kriterleri uluslararası kabul ve tekrarlanabilirliği olan yaş, tanı anı beyaz küre sayısı ve tanıda ekstramedüller hastalık gibi faktörlere dayanmakta idi. Ayrıca hem POG hem de CCG, tedaviyi geliştirmek için hasta sonuçları üzerinde etkili olduğu gösterilen ilave risk faktörlerini de kullanmışlardır (örneğin; ploidi, blast karyotipi ve erken morfolojik yanıt) (107).

CCG ve POG, 2000 yılında Çocuk Onkoloji Grubu'nu (COG) oluşturmak için birleşmişlerdir. Bu birleşme ALL'de yeni bir sınıflandırma sistemi ve tedavi algoritması geliştirmek için sağkalımı öngören klinik, biyolojik ve erken yanıt verilerinin analizine olanak sağlamıştır (107). ALL için birçok başarılı tedavi rejimi vardır. Tüm ALL rejimleri, SSS profilaksisi ile indüksiyon, konsolidasyon, (remisyonun yoğunlaştırılması) ve uzun süreli koruma gibi belli tedavi unsurlarını içerir (76). İndüksiyon tedavisinin amacı tam remisyonu ve normal hematopoezi tekrar sağlamaktır (108). Çoğu indüksiyon rejiminin süresi 4 ila 6 haftadır (3). Tedavinin temelini tipik olarak risk sınıflamasına bağlı olarak antrasiklinli veya antrasiklinsiz vinkristin, kortikosteroidler, asparaginaz ve intratekal kemoterapi oluşturur. (109, 110). Bu rejim %95-98 oranında remisyon sağlar (76).

SSS tedavisinin başlatılması, indüksiyon tedavisinin ayrılmaz bir bileşenidir. Kemik iliği incelemesi ile tanı konulduktan sonra, teşhis ve tedavi amacıyla lomber ponksiyon yapılır. Genellikle meninkslerin periferik kan lenfoblastlarıyla yanışıklıkla beslenmesinin teorik riskini azaltmak için ilk tanısal lomber ponksiyon ile intratekal tedavinin verilmesi önerilir. Teşhis lomber ponksiyonuna ek olarak, intratekal kemoterapi, tedavinin ilk ayında genellikle en az bir kez daha uygulanır. İlk alınan SSS örneğinde lenfoblastları olan hastalar (SSS-2 veya SSS-3 durumu veya blastların olduğu travmatik lomber ponksiyon), indüksiyon fazı sırasında SSS lenfoblastları olmayanlardan (SSS-1 durumu) daha fazla intratekal kemoterapi alır (111).

Kanser ve Lösemi Grubu B 8811 çalışmasının (CALGB 8811) rejimi 4 haftalık uzun indüksiyon programı, 1. gün siklofosfamid, devam eden üç gün ardışık daunorubisin, haftalık vinkristin, iki haftada bir L-ASP ve üç hafta prednizon tedavilerini içerir (112).

Medical Research Council (MRC) United Kingdom ALL (UKALL) XII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 rejiminde, indüksiyon dört

haftalık iki faza ayrılır. CALGB 8811'in tersine, siklofosfamid, indüksiyon faz I'de ihmal edilir, ancak SSS profilaksisi için tek bir doz intratekal metotreksat ilave edilir. İndüksiyon fazında, siklofosfamid, sitarabin, oral 6-merkaptopurin (6-MP), dört ilave intratekal doz metotreksat dozu ve SSS pozitifse kraniyal radyoterapi ile birlikte verilir. İndüksiyon terapisinden sonra hastalara lökovorin kurtarmalı metotreksat ve L-ASP ile üç kez yoğunlaştırma tedavisi uygulanır (113).

Hiper-Siklofosfamid, Vinkristin, Adriamisin ve Deksametazon (HCVAD)/Metotreksat-sitarabin rejimi diğer yaklaşımlara alternatif bir yapı kullanmaktadır. Dört döngü yüksek doz sitarabin ve metotreksat ile dönüşümlü olarak dört döngü hiperfraksiyone siklofosfamid, vinkristin, doksorubisin ve deksametazondan oluşur. Önceden belirlenmiş SSS tutulumu riskine bağlı olarak 4-16 doz intratekal kemoterapi ile SSS profilaksisi uygulanır (114).

Çeşitli çalışmalar, deksametazon kullanmanın prednizonun aksine SSS'de daha yüksek konsantrasyonlar elde etme gücünden dolayı daha yararlı olduğunu göstermiştir. Ancak genel sağkalımı karşılaştıran hiçbir çalışma olmadığından, birbirlerine karşı üstünlükleri henüz bilinmemektedir (115, 116).

Genellikle indüksiyon tedavisi sonrasında elde edilen tam remisyona; hastalığa atfedilen semptomların (örneğin, ateş ve kemik ağrısı), hepatosplenomegali, lenfadenopati veya rezidüel lösemik doku infiltrasyonunun diğer klinik kanıtları gibi hastalıklarla ilgili fiziksel bulguların olmaması ve periferik yaymada blast olmadan normal kan sayımı (minimum düzeyde $500/\text{mm}^3$ granülosit, $75.000/\text{mm}^3$ trombosit ve 12 g/dl hemoglobin), %5'in altında blast hücreleriyle birlikte uygun megakaryositler, normal granülositik ve eritroid prekürsörlerine sahip orta derecede hücreli bir kemik iliği ve normal beyin omurilik sıvısı (BOS) incelemesi (sitoloji dahil) ile tanımlanır (76).

4-6 haftalık tedavinin ardından remisyona sağlanamaması (indüksiyon yetersizliği) nadirdir (hastaların %5'inden azında) ve yüksek lökosit sayısı veya T hücre fenotipi olan hastalarda daha sık görülür (117, 118). İndüksiyon yetersizliği öyküsü olan hastalarda genel sağkalım oranları %20-30'dur (119).

İndüksiyondan sonra, uygun hastalar allojenik kök hücre nakline (Allo-SCT) giderken, diğer hastalar yoğunlaştırma/konsolidasyon ve koruma tedavisine devam eder (120). İlk remisyonadaki Allo-SCT, başlangıçta indüksiyon yetersizliği olan

hastalarda sonucu iyileştirebilir (121). Büyük retrospektif bir seride, T hücre lösemili hastaların, allojenik kök hücre nakli ile kemoterapiye göre daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir (119).

Konsolidasyon tedavisi, farklı protokollerde değişiklik gösterir, ancak genellikle indüksiyondaki benzer ajanlar kullanılır ve zaman zaman SSS profilaksisi için intratekal kemoterapi ve kraniyal radyasyon içerir (37, 120). Amaç, hastalık yükünü daha da azaltmak ve sonraki nüks riskine dayanarak tedavinin yoğunluğunu ayarlamaktır (3).

Yaygın olarak kullanılan konsolidasyon rejimi ilk olarak Alman Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) çalışma grubu tarafından tanıtılmıştır (122). Bu konsolidasyon şeması (1) siklofosfamid, düşük dozlu sitarabin ve bir tiyopurinden (merkaptopürin veya tiyoguanin) oluşan ilk indüksiyon fazından hemen sonra 4 haftalık bir kemoterapi kürü (bazen "konsolidasyon" veya "indüksiyon IB" olarak adlandırılır), ardından (2) lökovorin kurtarması olan veya olmayan yüksek dozlu veya artan dozlarda metotreksat dozlarını içeren bir ara bakım aşamasını ve daha sonra (3) tipik olarak başlangıçtaki indüksiyon/konsolidasyon döngüleri sırasında kullanılan aynı ajanları içeren bir re-indüksiyon kürünü içerir. Bir yerine iki gecikmeli yoğunlaştırma döngüsünün kullanımını içeren bu rejim, başlangıçtaki indüksiyon tedavisine yavaş morfolojik yanıtı olanlar da dahil olmak üzere, yüksek riskli hastalar için iyileştirilmiş sonuçlara yol açmıştır (123, 124).

Dana-Farber Kanseri Enstitüsü (DFCI) ALL Konsorsiyumu, 20 ila 30 hafta L-ASP ve yüksek riskli hastalar için ilave doksorubisin dozları içeren alternatif bir konsolidasyon rejimi kullanmaktadır (125).

Hemen hemen tüm mevcut tedavi rejimleri, daha az yoğun kemoterapinin olduğu bir devam etme veya bakım terapisi aşamasını içerir (3). Koruma tedavisi ile amaç minimal kalıntı hastalık (MRD) değerlendirmesi ile ölçülen rezidüel hastalığı ortadan kaldırmaktır (76). Koruma, indüksiyon sonrası 2-3 yıl boyunca uygulanır; bunun ötesinde faydası olmadığı gösterilmiştir (37, 120).

Bazı farmakolojik çalışmalar, 6-MP ve metotreksatın koruma fazı boyunca oral alımından sonra değişken biyoyararlanımlar göstermiştir (126). Bunun önemli prognostik etkileri olabilir, çünkü 6-MP ve metotreksatın ana metabolitleri tiyoguanin nükleotitleri ve metotreksat poliglutamatin düşük hücre içi seviyeleri, nüks riskinin

daha yüksek olmasıyla ilişkilendirilmiştir (127). Değişken biyoyararlanım, eşzamanlı yiyecek alımı da dahil olmak üzere ilaç emilimini engelleyebilecek çeşitli faktörlerin sonucu olabilir (128). Oral 6-MP'in, akşamları yemek veya süt olmadan verildiği takdirde biyoyararlanımın düzeldiği görülmüştür (128, 129). İlaç metabolizmasında yer alan genlerdeki polimorfizmler de ilaç aktivasyonu ve klirensini etkiler (130). Koruma tedavisi sırasında maksimum tolere edilen metotreksat ve 6-MP dozlarının uygulanması, kemoterapi süresince düşük lökosit veya nötrofil sayımı olan hastaların düşük nüks oranlarına sahip olduğunu gösteren çalışmalarla önerildiği gibi, sonucu iyileştirebilir.

6-Tiyoguanin (6-TG), daha yüksek hücre içi tiyoguanin nükleotitleri seviyesine yol açan tiyopurindir (131). Ayrıca, in vitro lenfoblastların hücre ölümünde 6-MP'den daha güçlü olduğu gösterilmiştir (132). Bununla birlikte koruyucu tedavi sırasında 6-TG kullanımı, veno-okluzif hastalık, hepatotoksisite ve sirozun yanı sıra enfeksiyonun neden olduğu yüksek ölüm oranları ile ilişkilendirilmiştir (133, 134). Bu yüzden 6-MP, koruma fazında tercih edilen tiyopurindir (3).

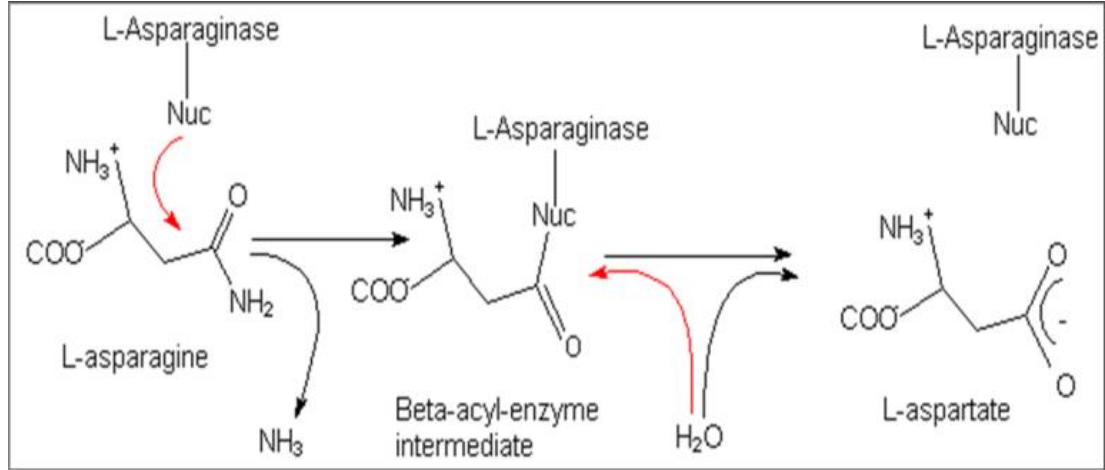
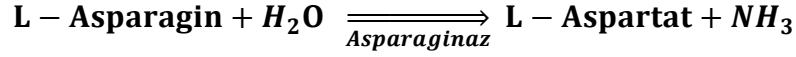
SSS Tedavisi:

1960'larda, ALL'li hastalarda hematolojik remisyon süresinin uzatılmasında sistemik kemoterapi daha etkili hale geldiğinden, nüks bölgesi olarak SSS lösemi insidansı daha yaygın hale gelmiştir (135, 136). Tüm hastaların SSS'sinde subklinik bile olsa lösemik hücrelerin mevcut olduğu ve bu hücrelerin sistemik olarak uygulanan kemoterapiden kan-beyin engeli ile korunduğu varsayılmıştır (137). Böylece, SSS'nin "farmakolojik koruma alanı" (yani, sistemik uygulanan kemoterapötik ajanların zayıf bir şekilde nüfuz ettiği anatomik alan) olduğu kavramı ortaya çıkmıştır (138, 139). 1970'lerde subklinik SSS lösemisini tedavi etmek için radyasyon terapisinin uygulanması, çocukluk çağı ALL'sinde %50'ye varan EFS sağlamıştır (140).

ALL için tüm başarılı tedavi rejimleri, SSS lösemisine yönelik tedaviyi de içerir. SSS'ye yönelik tedaviler için seçenekler arasında kraniyal ışınlama, intratekal kemoterapi ve SSS penetrant sistemik kemoterapi bulunur (141). Glukokortikoidler, yüksek doz metotreksat ve sitarabinin BOS'a penetre olduğu gösterilmiştir (142-144). Ayrıca sistemik uygulanan asparaginazın, BOS asparagin seviyelerini etkili bir şekilde azalttığı da gösterilmiştir (145).

2.2. L-asparaginaz

L-asparaginaz (L-ASP), L-asparagin'in aspartik asit ve amonyağa dönüşümünü katalize eden bir enzimdir (146, 147). L-ASP reaksiyonları şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. L-asparaginaz reaksiyonlarının şematik gösterimi (148)

L-asparagin, lösemik hücreler için esansiyel bir amino asittir ancak normal hücre büyümesi ve yaşayabilirliği için önemsiz olarak kabul edilir (147). Normal hücreler L-asparagini sentezleyebilir ve bu nedenle amino asitin L-ASP ile indüklenmiş tükenmesinden daha az etkilenir, buna karşın lösemik hücreler amino asidi sentezleyemez ve protein sentezini korumak için eksojen L-asparagin kaynaklarına bağımlıdırlar (146, 147).

İnsanlarda asparaginaz kullanılan ilk vaka raporları, 1960'lı yılların ortalarında rapor edilmiştir (149, 150). Her ne kadar çeşitli lösemik tümörler L-ASP tedavisine cevap verse de en yüksek cevap oranı ALL hastalarda gözlenmiştir (150-153). Asparaginazın keşfedilmesine kadar, ALL hastalarında induksiyonda standart kemoterapi vinkristin ve prednizon kullanımını içermekteydi (150). L-ASP'nin keşfinden sonra vinkristin ve prednizon gibi ajanlar ile kolayca kombine edilmeye başlanmış ve kombinasyon kemoterapi rejimlerinde göz önünde bulundurulması gereken ideal bir ilaç haline gelmiştir (147). Çalışmalar asparaginaz içeren tedavi rejimlerinin klinik sonuçlarının asparaginaz içermeyenlere göre daha iyi olduğunu

ortaya koymuştur (154-157). ALL'li çocuklarda vinkristin ve prednizon kombinasyonu, hastaların yaklaşık %85'inde remisyonu sağlarken L-ASP eklenmesi remisyon oranını yaklaşık %95'e yükseltmiştir (158).

L-ASP'ın aktivitesi ve tolere edilebilirliği, çocuklarda yetişkinlerden daha iyidir (147). Bununla birlikte, L-ASP kısa eliminasyon yarı ömrüne ve hızlı klirense sahiptir; bu nedenle, klinik etkinliğin sağlanması için yüksek dozda ve sık aralıklarla verilmesi gerekir (159, 160). L-ASP ayrıca immünojeniktir ve terapötik dozlarda ciddi anafilaktik reaksiyonlar ile ilişkilendirilmiştir (147, 161).

Asparaginaz, çeşitli bakteri kaynaklarından elde edilmiştir, ancak klinik uygulamada geniş kullanımı olan iki ürün, *E. coli* ve *Erwinia*'dan türetilmiş ürünlerdir. *E. coli* asparaginazın yarılanma ömrü yaklaşık 24 saat, *Erwinia* asparaginazın 10 saattir (162). *Erwinia* asparaginaz, *E. coli*'den türetilmiş asparaginazlardan immünolojik olarak farklıdır, bu nedenle immünolojik çapraz reaktiviteye sahip değildir (163). Yakın bir zamanda, L-ASP ile kovalent bir polietilen glikol bağı olan Polietilen Glikol L-asparaginaz (Pegasparaginaz, PEG-ASP) geliştirilmiştir (162). Enzimi birleştirmenin amacı, eliminasyonunu ve immünojeniteyi azaltmaktır (162, 164). PEG-asparaginazın yarılanma ömrü 15 gündür (165). L-ASP ile ilişkili istenmeyen etkiler; aşırı duyarlılık reaksiyonları, hepatik toksisite, pankreatik toksisite ve diğer yan etkiler başlığı altında toplanabilir.

1) Aşırı duyarlılık reaksiyonları:

Tedaviyle ilişkili en yaygın toksisitedir (166). Görülme sıklığı %3-45 arasında değişmekte olup çeşitli faktörlere bağlıdır (167-169). İmmün yanıtlar, hastalarda anti-asparaginaz antikorlarının gelişimi ile karakterizedir (169, 170). Bu antikorlar asparaginaz molekülüne bağlanarak enzimatik aktivitesini ve dolayısı ile asparaginaz aktivitesini azaltır (169-172). L-ASP'a karşı "klinik aşırı duyarlılık" ve "sessiz inaktivasyon/subklinik aşırı duyarlılık" olarak adlandırılan iki tür aşırı duyarlılık yanıtı vardır. Klinik aşırı duyarlılık, bilinen bir antijene immün yanıt veren belirti ve semptomların olduğu alerjik reaksiyon olarak tanımlanır (173). Alerjik reaksiyonların spektrumu geniştir. Bazı hastalarda enjeksiyon bölgesinde lokal reaksiyonlar gelişirken, bazılarında bronkospazm ve anafilaksi görülür. Duyarlılık reaksiyonları IgG veya IgE tipi antikorlar ile ilişkilidir. (174). Antikor geliştiren hastalarda klinik aşırı duyarlılık reaksiyonu görülme olasılığı daha yüksek olsa da subklinik aşırı

duyarlılık veya sessiz inaktivasyon denilen alt grupta immün yanıtın belirgin belirtileri olmadan anti-asparaginaz antikorları gelişmektedir (175, 176). Subklinik aşırı duyarlılığın belirlenmesi, anti-asparaginaz antikorlarının veya serum asparaginaz aktivite seviyelerinin gerçek zamanlı ölçümünü gerektirir (176). PEG-ASP'ın, çocuklarda *E. coli* ve *Erwinia* asparaginaz'dan daha az immünojenik olduğu gösterilmiştir (147, 177).

2) Hepatik toksisite:

L-ASP alan hastaların hemen hepsinde, karaciğer fonksiyonu ve hepatik transaminazlarda anormallikler bildirilmiştir (178-180). Bu anormallikler ilaç kesildikten sonra 2-3 hafta içinde düzelir. Karaciğer yetmezliği nadirdir (181, 182). Bununla birlikte, mikroveziküler ve makroveziküler yağlanma, hastaların yaklaşık olarak %87'sinde görülebilir ve L-ASP tedavisinin kesilmesinden sonra sekiz aydan fazla süre devam edebilir (181). Daha az göze çarpan diğer morfolojik değişiklikler, hepatosellüler nekroz ve karışık enflamatuvar hücre infiltrasyonudur (183).

Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, L-ASP'ın neden olduğu hepatik toksisite, glutamin eksikliği, uzun zincirli yağ asitlerinin bozulmuş mitokondriyal β -oksidasyonu ve ardından hepatositlerdeki yağ asidi ve trigliserit birikimine bağlı mikro ve makrovasküler steatoz ile karakterizedir (181, 183, 184).

L-ASP tarafından indüklenen karaciğer protein sentezindeki azalma, mitokondriyal β -oksidasyonu için gerekli olan proteinlerin eksikliğine bağlı olarak gelişir (185). β -oksidasyonun inhibisyonu, hücreleri açlık sırasında en önemli enerji kaynaklarından mahrum eder, serbest yağ asitleri metabolize edilemez ve laktat ve reaktif oksijen radikalleri artar ve birikir. Birikmiş radikaller glutamin eksikliği sonucu yıkılamaz, aerobik metabolizmada bozulmaya neden olan ve buna bağlı olarak laktik asidoz ve trigliserit birikimine neden olan mitokondriyal DNA hasarına yol açar. Ayrıca bazı çalışmalar, hücre içi glutamin eksikliğinin mitokondriyi hedef alabildiğini ve apoptotik bir tepkiye neden olabileceğini göstermiştir (186).

3) Pankreatik toksisite:

L-ASP ile ilişkili pankreatit, pediatrik ALL hastaların %2-18'inde görülür (19, 187-190) ve en sık olarak ilacın 2 ila 44. gününde ortaya çıkar (190-193). Klinik spektrum, hafif amilaz/lipaz yüksekliğinden, pankreas yetersizliği, psödokist oluşumu ve kanamayı içeren hayatı tehdit edici komplikasyonlara kadar değişir. Bazı yayınlar

pankreatite bağı ölüm oranının %21 olduğunu ifade etmiştir (188). L-ASP tedavisinin dozu, süresi veya formülasyonu ile pankreatit gelişimi arasında net bir ilişki gözlenmemiştir (188, 192). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, L-ASP'a bağı pankreatit için tanımlanmış risk faktörlerini belirleyememiştir, bununla birlikte yaşın artması ve antrasiklinler ve/veya steroidlerle birlikte kombinasyon pankreatit riskini artırabilir (167). Hematolojik malignensili hastalarda yapılan bir çalışmada, L-ASP ile birlikte daunorubisin veya prednizon alan hastalarda pankreatit riskinin arttığını, ancak L-ASP+deksametazon alan hastalar için bu riskin azaldığını ortaya koymuştur (192). L-ASP ile yeniden tedavi sonrası tekrarlayan pankreatit riski hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (167). Çeşitli çalışmalar farklı oranlarda nüks bildirmişlerdir. (188, 192, 194). L-ASP ile ilişkili pankreatit gelişimine henüz tanımlanamayan bir genetik yatkınlığın sebep olabileceği ve L-ASP ile yeniden tedavinin yüksek tekrarlama olasılığı ile ilişkili görüldüğü öne sürülmektedir (167). L-ASP preparatları arasında pankreatit sıklığı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (11, 172, 187, 194). Bir retrospektif inceleme, PEG-asparaginazdan sonra pankreatit insidansının arttığını bildirmiştir (190).

4) Diğer yan etkiler:

L-ASP tedavisi esnasında non-ketotik hiperglisemi %11-19 oranında görülmektedir (178, 179). L-ASP ile ilişkili hiperglisemi, kanda insülin seviyelerinin azalması, insülin reseptör bölgelerinin azalması ve hiperglukagonemi ile ilişkilendirilmiştir (195-197). Diyabetik ketoasidoz, ALL'li hastaların sadece %1-3'ünde görülür ve nadiren uzun süreli insülin tedavisi gerektirir (198, 199).

ALL'li çocuklarda, tromboemboli insidansı %1,1 ila %36,7 arasında değişmekte olup L-ASP tedavisi, venöz tromboemboli (VTE) gelişimi için en önemli risk faktörlerinden biridir (200, 201). Pıhtılaşma faktörleri, asparaginazın etkilerine karşı duyarlıdır. L-ASP kullanımı ile fibrinojen, faktör II, VII, VIII, X, antitrombin 3 ve protein C seviyelerinde düşüş olduğu tanımlanmıştır (202-204). Koagülasyon faktörlerinin üretiminde değişiklik nedeniyle VTE riskini artırsa da, L-ASP ve kortikosteroidlerin birlikte uygulanması da VTE riskini artırır (200).

ALL hastalarında asparaginaz toksisitesinin yönetimi için standart bir kılavuz bulunmamaktadır. Yan etkiler bazen kullanımı sınırlamakta, ALL tedavisinde gecikmeye ve bazen kesilmesine sebep olmaktadır. Bu gereklilik ortamında yapılan

çalışmalarda ilaçlar için biyoyumlu ve biyobozunur bir araç olarak kullanılan kırmızı kan hücrelerinin L-ASP'ı koruduğu, yarı ömrünü arttırdığı ve yan etkilerin oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Kırmızı kan hücreleriyle kapsüllenmiş L-ASP (GRASPA) formülasyonu, daha az hipersensitivite reaksiyonları ve trombotik olay, daha uzun bir yarı ömür ve genel olarak, özellikle yaşlı popülasyonda genel olarak tolere edilebilirlik ile ilişkili olarak geliştirilmiştir ve klinik çalışmaları devam etmektedir (205).

2.3. Antioksidan Sistem

Memeli yaşamı, mitokondriyal elektron taşınmasında elektronların son alıcısı olarak oksijene bağlıdır, ancak bu işlem aynı zamanda toksik metabolitler üretir (206). Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri, mitokondriden sitoplazmaya sızar, burada DNA, proteinler, lipitler ve karbonhidratlar dahil olmak üzere çeşitli biyolojik molekülleri okside ederek hücrenel hasara neden olur. Lipid ve protein peroksidasyon reaksiyonları, çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynar (207). Ayrıca, oksidatif stres, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlikten kaynaklanır ve membran lipitleri, proteinleri ve nükleik asitlere zarar verir (20, 21).

Oksidatif stres, hematolojik hastalıklar (talasemi majör, orak hücreli anemi, idiopatik trombositopenik purpura gibi) ateroskleroz, diabetes mellitus, romatoid artrit ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere, birçok kronik hastalıkla ilişkilidir (208). Oksidatif stresteki artış sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri hücre içi lipitlerin, proteinlerin ve DNA'daki bazların çift bağlarına saldırır ve hidrojen atomunu kopararak zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatırlar. Serbest radikallerin etkileri ile makromoleküllerin oksidatif hasarı sonucunda açığa çıkan malondialdehit (MDA), protein karbonil, propanal, 8-hidroksiguanin, 4-hidroksinonenal gibi ürünlerin vücut sıvıları ve dokularda biyokimyasal yöntemlerle ölçülmesi ile oksidatif hasar varlığı tespit edilir (209).

Reaktif oksijen türleri biyolojik membranlarda bulunan poliansatüre yağ asitlerinde (PUFA) oksidasyona yol açarak lipit peroksidasyonunu başlatırlar (209). MDA, hücrelerde en bol bulunan lipid peroksidasyon ürünlerinden biridir, ayrıca prostaglandin biyosentezi yoluyla endojen olarak da üretilebilir (210-212). Tiyobarbitürik asit (TBA) ile kolay reaksiyonu nedeniyle, omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu için uygun bir biyobelirteç olarak uzun yıllardır

yaygın olarak kullanılmaktadır (213, 214). MDA'nın insan ve memeli hücrelerinde mutajenik (215, 216), farelerde ve sıçanlarda kanserojen (217, 218) olduğu gösterilmiştir. MDA, DNA ile çeşitli mutajenik eklentiler oluşturabilir. Pirimido [1, 2- α] purin-10(3H)-one (M1G), insan hücrelerinde yüksek oranda mutajen olduğu kanıtlanan guanin kalıntıları ile reaksiyona girerek oluşturulan ve kronik oksidatif stres altındaki insan dokusunda tespit edilen ana bir MDA-DNA eklentisidir (211, 219). MDA ayrıca fizyolojik koşullarda amino asitler ve proteinlerle reaktiftir; bununla birlikte diğer lipid peroksidasyon ürünleriyle karşılaştırıldığında çok daha az reaktiftir (210, 220). Dokulardaki MDA'nın en az %80'inin proteinlere geri dönüşümlü olarak bağlı olduğu öne sürülmüştür (221, 222).

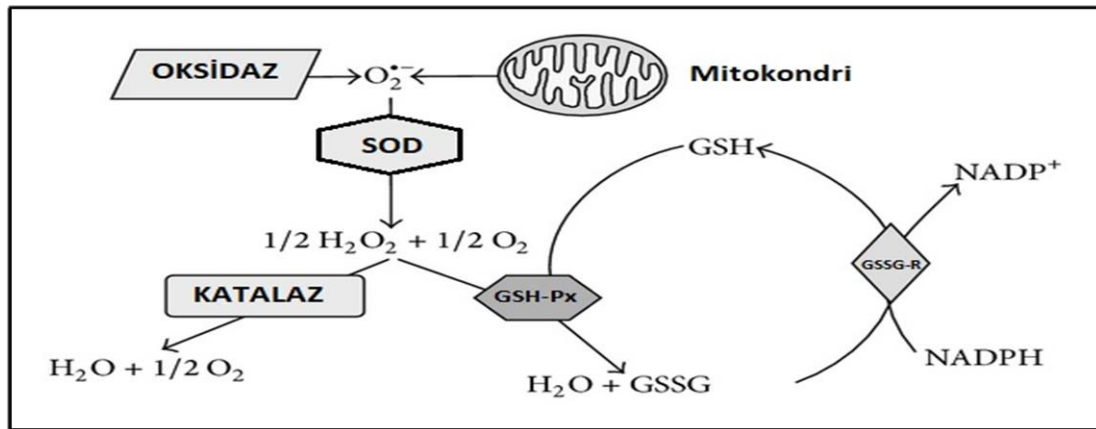
Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek, meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere görev yapan savunma sistemine “antioksidan sistem ” denir (223). Vücutta iki tip antioksidan sistem vardır: (1) toksik maddelerin oluşumunu engelleyen antioksidan enzimler ve (2) üretilen serbest radikalleri ve tekli oksijeni engelleyen antioksidan küçük moleküller (27).

Memeli hücrelerinde, enzimatik savunma sistemi esas olarak süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktazdan (GSSG-R) oluşur (26, 27). SOD, oksijen toksisitesine karşı ilk savunma hattıdır (224). Süperoksit, üretildiği organelin membranından geçemediği için hücresel fraksiyonda birikebilir (27). Bu birikimi önlemek için insanlarda üç SOD formu vardır: bakır ve çinko içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD-1) sitozolde, manganez içeren süperoksit dismutaz (Mn SOD-2) mitokondride ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC SOD-3) hücre dışı sıvılarda bulunur (225). Enzim, süperoksitin, dokulara süperoksitten daha az toksik olan hidrojen peroksit dönüşümünü katalize eder. Hidrojen peroksit, sitozol ve mitokondride bulunan ve selenyum içeren bir enzim olan GSH-Px ya da peroksizom organelinde bulunan CAT ile metabolize edilir (27).

CAT, bakırı kofaktör olarak kullanan, hem içeren bir enzimdir; hidrojen peroksit için özeldir. Hidrojen peroksitin, su ve oksijene dönüşümünü katalize eder (27).

GSH-Px enzimi, glutatyonun indirgenmiş (redükte) formunu (GSH), oksitlenmiş hale (GSSG) dönüştürmektedir (226). Bir tiyol bileşiği taşıyan glutatyon,

serbest radikallerin etkilerini önleyen/azaltan peroksidaz, transferaz gibi enzimlerin substratı olarak görev yapmaktadır ve lipidleri peroksidasyondan korumaktadır. GSH-Px, redükte glutatyonu yükseltgerken (oksitlerken) hidrojen peroksiti de suya çevirir (227). GSSG-R ise GSSG'yi tekrardan GSH'ye dönüştüren enzimdir. Koenzim olarak NADPH kullanır (226). Antioksidan enzimlerin şematik görünümü şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Antioksidan enzimlerin şematik görünümü (228)

Enzimatik olmayan antioksidanlar, vitaminler (C ve E vitaminleri), β -karoten, GSH, sistein ve ürik asit gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşikler içerir (28).

2.3.1. N-asetilsistein (NAC)

GSH'nin öncüsü olan NAC, kimyasal formülü $C_5H_9NO_3S$ ve molekül ağırlığı 163,2 gr/mol olan bir tiyol (sülfidril içeren) bileşiktir (229). Esasen mukolitik olarak 30 yıldan uzun bir süredir kullanılmaktadır (230). Mukolitik etkisine ek olarak, akut zehirlenmeler (akrilonitril, paraquat), siklofosamid ve ifosamid kaynaklı hemorajik sistitin önlenmesi, radyoterapi sonrası akciğer fibrozisi, akut respiratuar distress sendromu, miyokardiyal iskemiden sonra reperfüzyon sendromu, romatoid artrit, amiyotrofik lateral skleroz, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu gibi oksidatif stres durumlarında kullanılmaktadır (231). İntravenöz ve oral NAC uygulaması, karaciğer koruyucu aktivitesi nedeniyle, asetaminofen zehirlenmesinin tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. (230).

Oral alımın ardından hızla emilir; ince bağırsak ve karaciğerde yoğun ilk geçiş metabolizmasına uğrar ve metabolitlerine dönüşür (232). NAC'ın faaliyetlerini ve koruyucu etkilerinin çoğunu oluşturan bu metabolitlerdir. (230). Araştırmacılar, NAC molekülünün oral biyoyararlanımının %4-10 arasında olduğunu bildirmişlerdir (232-234). NAC'ın tepe konsantrasyonları oral uygulamadan sonra bir saatten az bir sürede görülür (232, 233). Serbest NAC'ın plazma yarı ömrünün yaklaşık 2,15 saat olup 10-12 saat sonra hemen hemen tespit edilemez düzeylere iner (232). NAC'ın antioksidan etkisi çeşitli mekanizmalar ile gerçekleşir: Hücre içi seviyelerde, NAC, GSH sentezinin bir öncüsüdür ve GSH'nin biyosentezini destekleyen sistein havuzunu sağlar. İkinci mekanizma, NAC'ın hücre dışı seviyede bir nükleofil olarak doğrudan oksidan radikalleri üzerinde etkili olmasıdır. NAC ayrıca glutatyon-S-transferaz aktivitesini artırır (231).

Hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak kanıtlar, NAC'ın GSH'nin hücre içi biyosentezini artırabildiğini göstermektedir (235). NAC, hücre kültürü deneylerinde, hücrel GSH biyosentezi için kültür ortamından sistin alımını düzenler (235). *In vivo* ortamda, eritrositlerde, karaciğer ve akciğer hücrelerinde hücre içi GSH seviyelerini artırabilir ve GSH depolarını yenileyebilir (236, 237). Deneysel sonuçlar, NAC'ın bir GSH öncüsü olarak hareket ederek ve hücre içi GSH konsantrasyonlarını arttırarak bir herbisit olan paraquatın neden olduğu sitotoksositeye karşı koruyucu bir etki yaptığını göstermektedir (238). NAC ayrıca, asetaminofen zehirlenmesinde, hücre içi GSH'nin bir öncüsü olarak glutatyon seviyelerini tüketir ve sitozolik glutatyon transferaz aktivitesini inhibe eder, böylece panzehir olarak görev yapmış olur (239, 240). NAC'ın, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmuş biliyer obstrüksiyona sekonder karaciğer sirozunda, membran akışkanlığının ve katalaz, mitokondriyal SOD ve farklı GSH-Px aktivitelerinin önemli ölçüde korunmasını sağladığı gösterilmiştir (241).

NAC ile *in vivo* tedavi, doğrudan etkili bazı mutajenlerin karaciğer ve akciğer dokusundaki detoksifikasyonunu artırabilir. NAC, GSH sentezini ve metabolizmasını teşvik ederek ve mutajenik/kanserojen maddelerin biyolojik olarak daha toksik bileşiklere transformasyonunu kısıtlayarak koruyucu etkiler ortaya koymaktadır. NAC hepatik ve pulmoner mikrozoamlardaki sitokrom p450 konsantrasyonlarını etkilemiyor gibi görünse de, NADP indirgemesinde (glukoz 6-fosfat dehidrojenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrojenaz), GSH indirgemesinde (GSSG-R) ve ksenobiyotiklerin

indirgeyici detoksifikasyonunda sitozolik enzim aktivitelerini uyarabilir (236). Hayvan deneylerinde, NAC'ın, akciğerlerde %100 oksijenin uzun süreli uygulanmasından kaynaklanan oksijen toksisitesine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (242).

NAC, radyasyondan koruyucu bir ajan olarak da başarıyla kullanılmıştır. Hematopoetik sistemi radyasyonun zararlı etkilerden koruduğu düşünülen IL-1, tümör nekroz faktörü-alfa ve interferon-gamayı stimüle ederek bu etkisini gerçekleştirmektedir (243).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada L-ASP ilişkili karaciğer ve pankreas toksisitesinin oluşumunda oksidatif hasarın rolü ve NAC'ın doku hasarı üzerine etkisinin ortaya konulması amaçlandı. Deney hayvanları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TİCAM) tarafından temin edildi. Çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji, Tıbbi Biyokimya, Biyoloji ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalları'nın da katılımı ile Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütüldü.

3.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onayı

Çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HAYDEK) 12.01.2017 tarih ve 571/2017 sayılı karar ile onay alındı.

3.2. Deney Hayvanları

Çalışmada Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, TİCAM'dan temin edilen 200-310 gram ağırlığında “*Wistar-albino*” türü 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Dişi sıçanların hormonal dengelerinin çalışmaya etki etme ihtimali nedeniyle erkek sıçan tercih edildi. Deney hayvanları $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %40-50 sabit nem oranında, 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda, standart kafeslerde, serbest pelet yem ve su alımı sağlanarak barındırıldı. Çalışma başlamadan bir hafta önce standart kafeslere konularak ortama alışması beklendi.

3.3. Çalışma Grupları

Hayvanlar hassas terazi ile tartılarak eşit ağırlıkta gelişi güzel olarak her birinde 10 adet sıçan olacak şekilde dört deney grubuna ayrıldı.

Grup 1 (Kontrol Grubu): İntraperitoneal (İP) olarak beş gün 0,02 ml/gr, serum fizyolojik (Deva Holding A.Ş., İstanbul, Türkiye) verildi.

Grup 2 (NAC Grubu): İP, beş gün, 200 mg/kg/gün, NAC (Nacosel[®], Haver Pharma İlaç A.Ş., İstanbul, Türkiye) verildi.

Grup 3 (L-ASP Grubu): İP, 10.000 U/kg, tek doz L-ASP (Leunase[®], Onko İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul, Türkiye) verildi.

Grup 4 (L-ASP+NAC Grubu): İP, 10.000 U/kg' dan tek doz L-ASP verildikten 24 saat sonra başlanmak üzere beş gün, İP, 200 mg/kg/gün NAC verildi.

3.4. Cerrahi İşlem ve Örneklerin Alınması

Sıçanlara, her grubun enjeksiyonların bitiminden 24 saat sonra cerrahi işlem yapılması planlandı. Deneyden sekiz saat önce aç bırakıldı ancak su alımları kısıtlanmadı. Denekler İP yolla 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar[®], Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg Xylazine HCL (Alfazyne[®] %2, 20mg/ml, 30 ml, Alfasan International B.V., Hollanda) verilerek uyutuldu. Uygun ortam ısısında saha temizliği (%10'luk Povidon İyodür (Batticon[®] solüsyon, Adeka, Türkiye) yapıldıktan sonra 21 gauge siyah iğneli steril enjektör (5cc-3/P, 21 G, Aysel[®], Adana, Türkiye) kullanılarak intrakardiyak yöntemle 5 ml kan alımını takiben orta hat üç cm'lik kesi ile batına girildi. Alınan kan örnekleri sarı kapaklı, polimer jelli serum tüplerine (Aysel Tube, Adana, Türkiye) alındı, 4000 rpm'de beş dakika santrifüj edilerek (Yuda 80-2A) serumları ayrıldı ve uygun koşullarda Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'na gönderildi. Cerrahi işlemler Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ile gerçekleştirildi. Her bir sıçandan histolojik inceleme için karaciğer ve pankreas dokusu alındı ve steril serum fizyolojik solüsyonu ile yıkandı. Karaciğerin sol lobu ve pankreasın yarısı %10 formalin içine konularak Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarı'na gönderildi. Kalan doku örnekleri oksidatif stres parametreleri çalışılmak için steril kaplara yerleştirilerek -80⁰ C'de saklanmak üzere Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'na gönderildi.

3.5. Biyokimyasal Değerlendirme

Serumda biyokimyasal parametrelerden glukoz, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), total bilirubin (TB), direkt bilirubin (DB), alkalen fosfataz (ALP), trigliserit (TG), kolesterol, amilaz, lipaz kolorimetrik yöntemlerde Roche Cobas 800 (Roche, Mannheim, Almanya) otoanalizöründe ölçüldü.

3.6. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Malondialdehit (MDA) düzeyinin ölçümü:

Dokulardan 0,1 gram tartıldı ve 1/10 oranında %1,15 potasyum klorür çözeltisi ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar +4°C, 1500x g'de 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısmından ölçümler yapıldı. Tablo 3.1'de belirtilen çözeltiler hazırlandı. Stok çözeltisi için 100 nmol/ml stok lipid peroksit standardı (1.1.3.3. tetraetoksipropan) hazırlandı ve 1:2 oranında seri dilüsyonlar yapıldı. Konsantrasyonları bilinen bu standart çözeltilerin absorbanansı belirtilen protokol izlenerek ölçüldü, okunan absorbanans değerleri ile standart kalibrasyon grafiği çizildi. Örneklerin konsantrasyonları standart kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı. Aynı homojenattan protein konsantrasyonları ölçüldü ve MDA konsantrasyonları örnek total protein konsantrasyonlarına oranlandı. Doku MDA sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

Tablo 3.1. Malondialdehit ölçümü deney prosedürü

	Kör	Örnek	Standart
1.1.3.3. tetraetoksipropan standardı	-	-	0,2 ml
Süpernatant	-	0,2 ml	-
SDS (%8,1)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Asetat tamponu (%20, pH:3.5)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
TBA (%0,8, pH:5.5-7)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Distile su	0,8 ml	0,6 ml	0,6 ml
95°C de 60 dk. inkübasyona (pembe renk oluşumu) bırakılır.			
Musluk suyu ile soğutulduktan sonra 1500 xg'de 10 dk. santrifüj edilir.			
Süpernatant 532 nm dalga boyunda köre karşı okunur.			

SDS: sodyum dodesil sülfat, TBA: tiyobarbitürik asit

Glutasyon (GSH) düzeyinin ölçümü:

Dokulardan 0,1 gram tartıldı ve 1/10 oranında soğuk 0,1 M, pH: 7.4 fosfat tamponu ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar +4°C 1500x g'de 15 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısmından ölçümler yapıldı. Hazırlanan çözeltiler ile tablo 3.2'de belirtildiği gibi ölçüm işlemi yapıldı. Stok çözeltisinin hazırlanması için 100 mg glutasyon, 100 ml distile suda çözüldü ve bu çözeltiden 1:2 oranında seri dilüsyonlar yapıldı. Konsantrasyonları bilinen bu standart çözeltilerin absorbanansı belirtilen protokol izlenerek ölçüldü, okunan absorbanans değerleri ile standart kalibrasyon grafiği çizildi. Örnek konsantrasyonları standart kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı. Aynı homojenattan protein konsantrasyonları ölçüldü ve GSH

konsantrasyonları örnek total protein konsantrasyonlarına oranlandı. Doku GSH ölçüm sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

Tablo 3.2. Glutasyon ölçümü deney prosedürü

	Kör	Örnek	Standart
Süpernatant	-	0,5 ml	-
Çöktürme çözeltisi	-	0,75 ml	-
Karıştırıldıktan sonra 1500 xg'de 15 dk. santrifüj edilir, buradaki süpernatantdan devam edilir.			
GSH standartı	-	-	0,5 ml
Süpernatant	-	0,5 ml	-
Distile su	0,5 ml	-	-
Sekonder Sodyum Fosfat	2 ml	2 ml	2 ml
DTNB	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Vorteksle karıştırılıp beş dakika beklenir ve 412 nm dalga boyunda köre karşı absorbansı okunur.			

GSH: Glutasyon, DTNM: 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit), Çöktürme çözeltisi: 1,67 gram metafosforik asit, 0,2 gram EDTA ve 30 gram NaCl bir miktar distile suda çözülür, bu çözeltiler birleştirilip son hacim 100 ml'ye tamamlanır. %1 Sodyum sitrat çözeltisi: 1 gram trisodyum sitrat tartılıp 100 ml distile suda çözülür. Belirtme reaktifinin hazırlanmasında kullanılır. Sekonder sodyum fosfat çözeltisi: 10,65 gram Na₂HPO₄ distile suda çözülür ve son hacim 250 ml'ye tamamlanır. Belirtme reaktifi: 0,8 gram DTNB önceden hazırlanmış olan %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülür ve son hacim 200 ml'ye tamamlanır.

Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin ölçümü:

Dokulardan 0,1 gram kesit alındı, 1/10 oranında soğuk 0,1 M, pH:7 fosfat tamponu ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar +4°C 3500x g'de 10 dk. santrifüj edilip, süpernatant kısmından ölçümler yapıldı. Hazırlanan çözeltiler ile tablo 3.3'de belirtildiği gibi ölçüm işlemi yapıldı. CAT enzim aktivitesinin hesaplanmasında Lartillot ve vd. tarafından bildirilen formül kullanıldı (Lartillot, Kedziora & Athias, 1988; Nelson & Kiesow, 1972) (Şekil 3.1). CAT spesifik aktivitesi; katalaz aktivitesinin, aynı homojenattan ölçülen örnek protein konsantrasyonuna oranlanmasıyla U/mg protein olarak hesaplandı.

$$Akt = \frac{A \cdot Vt}{\epsilon \cdot t \cdot Ve}$$

A: Enzimatik aktiviteden kaynaklı absorbans değişimi, Vt: Toplam reaksiyon hacmi (µl), ε: H₂O₂'nin 240 nm'deki ekstinksiyon katsayısı (0.0394), t: Reaksiyon süresi (dk.), Ve: Örnek hacmi (µl)

Şekil 3.1. Enzim aktivitesi formülü

Tablo 3.3. Katalaz ölçümü deney prosedürü

	Kör	Örnek
Tris-EDTA-HCl	100 µl	100 µl
H ₂ O ₂ (10 mM)	-	1800 µl
Distile Su	1900 µl	60 µl
37°C de 10 dk. inkübasyona bırakılır.		
Süpernatant	-	40 µl
240 nm dalga boyunda 3 dakika boyunca köre karşı absorbansı okunur. (Kinetik okuma yapılır.)		

Tris: Hidroksimetil, EDTA: etilendiamin tetraasetik asit, HCL: hidrojen klorür, H₂O₂: hidrojen peroksit, Tris-EDTA-HCl çözeltisi: 12,1 gram tris ile 0,186 gram disodyum EDTA tartılarak 40 ml distile suda çözülür. 2 M'lık HCl ile pH'sı 8'e ayarlanır ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Süpernatant 1/40 oranında seyreltildikten sonra kullanılır. H₂O₂, örnek tüplerini inkübasyona koymadan hemen önce tüplere konulmalıdır.

Kullanılan cihazlar:

- Eppendorf EDOS elektronik pipetleyici (Eppendorf EDOS 5222)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Roche Cobas c501 otoanalizör cihazı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya)

- Santrifüj/soğutmalı santrifüj (Nüve NF800 ve Jouan MR22)
- Spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601)
- Su banyosu (Nüve BM402)
- Tüplü ısıtıcı

3.7. Histopatolojik Değerlendirme

Alınan karaciğer ve pankreas örneklerinin %10'luk formalin fiksatifinde iki gün süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla üç-dört saat çeşme suyunda yıkandı. Çeşme suyuyla yıkanan doku parçalarının daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere iki kez 20'er dakika ksilolde bekletildi. Karaciğer ve pankreas örnekleri şeffaflandırılmalarının ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutularak, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5 mikrometre kalınlığında doku

kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C’de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde bir saat bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar birer saat iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eosin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri beşer dakika süreyle %96, %90, %80, %70’lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile iki dakika ve Eozin ile on dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki ayrı ksilolde 30’ar dakika tutularak şeffaflaştırıldı ve şeffaflaştırılan dokular daha sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskobik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapıldı ve tüm preperatların Olympus DP-70 dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

Yapılan incelemelerde çalışma bulguları baz alınarak ve literatür taramalarından da faydalanılarak karaciğer örnekleri için nekrotik hücre, sinüzoidal dilatasyon, hücresel infiltrasyon, konjesyon; pankreas dokusu için asiner hücre hasarı, adacık hücre hasarı, hücresel infiltrasyon, konjesyon ve ödem bulgularına bakılarak değerlendirilme yapıldı. Her bir kriter 0-3 arasında skorlandı. 0 puan hasar yok, 1 puan az hasar, 2 puan orta düzeyde hasar, 3 puan şiddetli hasar olarak tanımlandı (244).

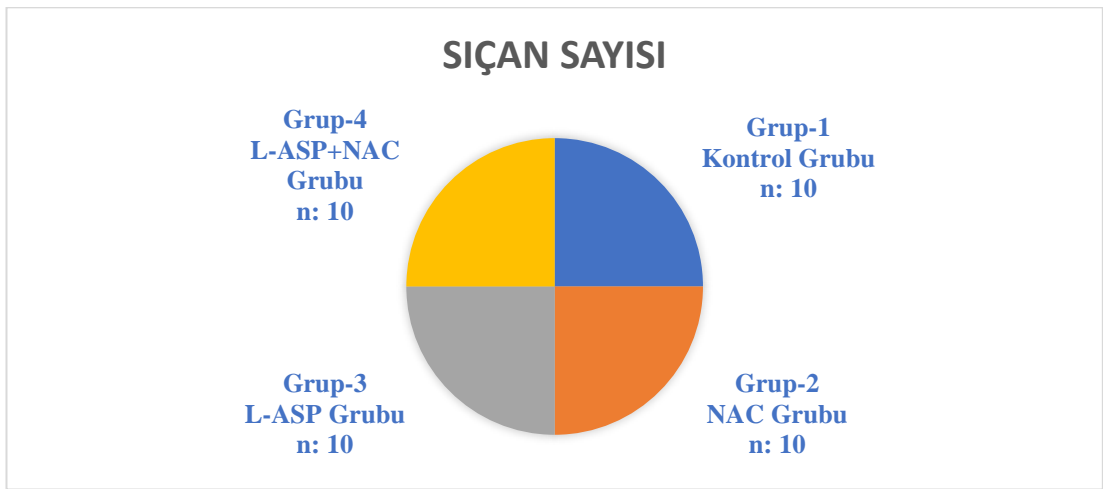
3.8. İstatistiksel Yöntem

Çalışma kapsamında elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS (Statistical Software for Windows, Version 18.0) paket programı kullanılarak yapıldı. Kategorik değişkenler Chi-Square testi ile karşılaştırıldı. Gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) testi kullanıldı. Ardından gruplar arası farklılıkların anlamlı olup olmadığı ve anlamlılık düzeyleri Tukey ve Tamhane testi kullanılarak incelendi. Çalışma gruplarına ait veriler ortalama \pm standart sapma (mean \pm SD) biçiminde gösterildi. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sıçanların Karakteristik Özellikleri

Sıçanların ortalama ağırlıkları $261,58 \pm 31,49$ (min-mak: 200-310) gram idi. Davranış bozukluğu ve iştah kaybına dair bir bulgu izlenmedi. Çalışma boyunca hayvanlarından ölen olmadı. Toplam 40 tane sıçan kullanıldı. Hayvanlar rastgele, her grupta 10'ar tane olacak şekilde dört gruba ayrıldı. Çalışma ve kontrol grubunun dağılımı şekil 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.1. Çalışma ve kontrol grubunun dağılımı

4.2. Biyokimyasal Analizler

Çalışma ve kontrol grupları arasında glukoz, AST, ALT, TB, DB, ALP, TG, kolesterol, lipaz düzeyleri açısından farklılık saptanmadı ($p > 0,05$). L-ASP grubunda amilaz yüksekliği mevcuttu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). Çalışma ve kontrol gruplarının laboratuvar parametrelerinin karşılaştırması tablo 4.1'de gösterildi.

Tablo 4.1. Çalışma ve kontrol gruplarının laboratuvar parametreleri

Değişkenler	Grup-1 Kontrol grubu	Grup-2 NAC grubu	Grup-3 L-ASP grubu	Grup-4 L-ASP+NAC grubu	p değeri
Glukoz (mg/dL)	313,40±65,56	299,70±62,99	320,1±71,51	343,50±53,20	>0,05
AST (U/L)	128 ±33,54	124,20±28,98	105±15,94	101,00±23,43	>0,05
ALT (U/L)	54,20±13,79	45,90±5,78	46,80±6,14	52,20±6,46	>0,05
TB (mg/dL)	0,04±0,016	0,036±0,013	0,04±0,015	0,039±0,015	>0,05
DB (mg/dL)	0,03±0,010	0,032±0,012	0,037±0,006	0,032±0,015	>0,05
ALP (U/L)	213,90±36,91	204,40±51,53	187,5±26,9	184,20±23,89	>0,05
TG (mg/dL)	28,70±10,14	21,50±10,22	25,90±10,42	25,80±8,32	>0,05
Kolesterol (mg/dL)	44,00±9,16	43,40±4,19	45,30±5,74	40,50±4,97	>0,05
Amilaz (U/L)	1900,70±167,85	1828,11±174	2066,6±143,5	1970±141,4	>0,05
Lipaz (U/L)	5,30±0,48	5,50±0,53	5,40±0,51	5,50±0,52	>0,05

AST: aspartat aminotransferaz, ALT: alanin aminotransferaz, TB: total bilirubin, DB: direkt bilirubin, ALP: alkalin fosfat, TG: trigliserit

4.3. Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi

Çalışma ve kontrol Gruplar arasında karaciğer ve pankreas MDA, GSH, CAT düzeyleri açısından farklılık saptanmadı. Çalışma ve kontrol gruplarının karaciğer ve pankreas dokularındaki MDA, GSH, CAT düzeyleri tablo 4.2 ve 4.3’de gösterildi.

Tablo 4.2. Çalışma ve kontrol gruplarının karaciğer dokusundaki MDA, GSH, CAT düzeyleri

Değişkenler	Grup-1 Kontrol grubu	Grup-2 NAC grubu	Grup-3 L-ASP grubu	Grup-4 L-ASP+NAC grubu	p değeri
MDA (nmol/mg)	3,80±1,28	3,02±,491	3,30±,89	2,90±,75	>0,05
GSH (nmol/mg)	6,57±2,14	5,09±2,140	6,24±2,14	6,01±2,14	>0,05
CAT (U/mg)	54,73±13,60	50,06±9,55	50,12±11,87	47,25±11,14	>0,05

MDA: malondialdehit, GSH: glutatyon, CAT: katalaz

Tablo 4.3. Çalışma ve kontrol gruplarının pankreas dokusundaki MDA, GSH, CAT düzeyleri

Değişkenler	Grup-1 Kontrol grubu	Grup-2 NAC grubu	Grup-3 L-ASP grubu	Grup-4 L-ASP+NAC grubu	p değeri
MDA (nmol/mg)	5,55±1,72	5,378±1,93	3,90±,97	4,87±2,14	>0,05
GSH (nmol/mg)	8,61±2,83	7,083±1,48	6,84±1,72	6,93±1,68	>0,05
CAT (U/mg)	49,10±20,65	56,24±20,65	54,57±20,65	53,18±20,65	>0,05

MDA: malondialdehit, GSH: glutatyon, CAT: katalaz

4.4. Histopatolojik İncelemeler

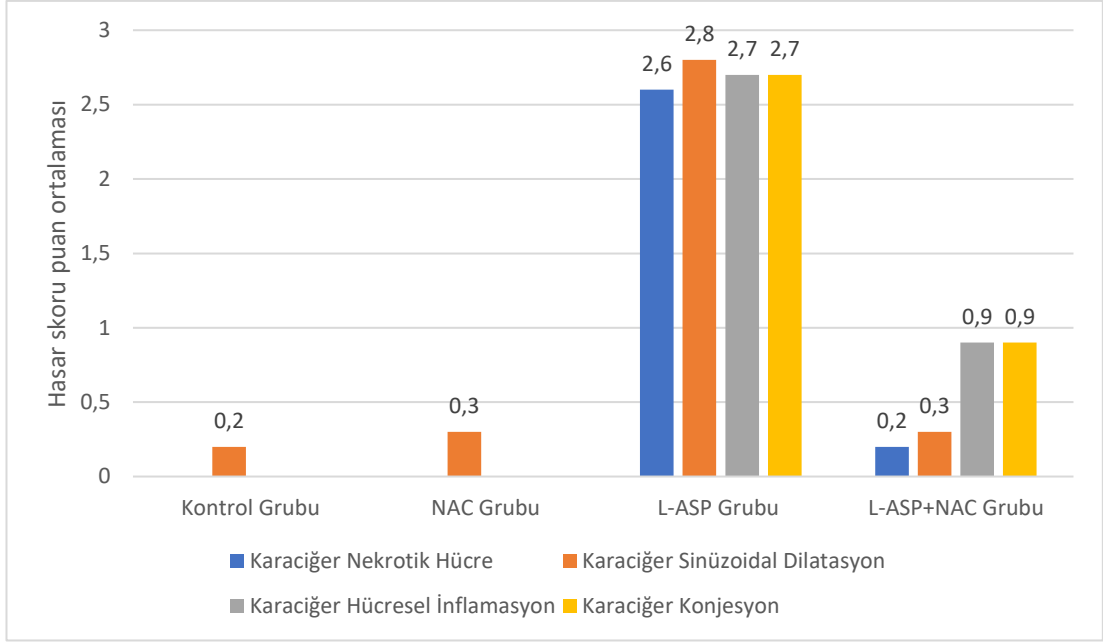
Karaciğerin histolojik yapıları incelendiğinde; grup 1 ve 2 de hiçbir sıçanda nekrotik hücre görülmedi. Grup 3’de dört sıçanda iki puan, altı sıçanda üç puan düzeyinde nekrotik hücre izlendi. Grup 4’de iki sıçanda bir puan düzeyinde nekrotik hücre izlendi, sekiz sıçanda ise nekrotik hücre izlenmedi. Grup 1’de iki sıçanda, grup 2’de üç sıçanda bir puan düzeyinde sinüzoidal dilatasyon görüldü. Grup 3’de iki sıçanda iki puan düzeyinde, sekiz sıçanda üç puan düzeyinde dilatasyon vardı. Grup 4 incelendiğinde sadece üç sıçanda bir puan düzeyinde hasar olduğu görüldü, yedi sıçanda hasar yoktu. Hücresel infiltrasyon grup 1 ve 2 de görülmezken grup 3’de üç sıçanda iki puan düzeyinde, yedi sıçanda üç puan düzeyinde hasar vardı. Grup 4’de üç sıçanda bir puan, üç sıçanda iki puan seviyesinde hücresel infiltrasyon vardı, dört sıçanda hasar yoktu. Grup 1 ve 2’de konjesyon görülmedi. Grup 3’de üç sıçanda iki puan, yedi sıçanda üç puan düzeyinde konjesyon vardı. Grup 4’de üç sıçanda bir puan, üç sıçanda iki puan seviyesinde konjesyon görüldü, dört sıçanda hasar yoktu. Gruplar arasında nekrotik hücre, sinüzoidal dilatasyon, hücresel infiltrasyon ve konjesyon skor dağılımları açısından istatistiksel açıdan anlamlı fark saptandı (Hepsi için $p<0,01$). Gruplar arasında karaciğer doku hasarı skorlarının karşılaştırması tablo 4.4’de gösterildi.

Tablo 4.4. Gruplar arasında karaciğer doku hasarı skorlarının karşılaştırması

	Grup-1 Kontrol grubu n(%)	Grup-2 NAC grubu n(%)	Grup-3 L-ASP grubu n(%)	Grup-4 L-ASP+NAC grubu n(%)	p değeri
Nekrotik Hücre					
0 puan	10 (%100)	10 (%100)	0	8 (%80)	<0,01
1 puan	0	0	0	2 (%20)	<0,01
2 puan	0	0	4 (%40)	0	<0,01
3 puan	0	0	6 (%60)	0	<0,01
Sinüzoidal Dilatasyon					
0 puan	8 (%80)	7 (%70)	0	7 (%70)	<0,01
1 puan	2 (%20)	3 (%30)	0	3 (%30)	<0,01
2 puan	0	0	2 (%20)	0	<0,01
3 puan	0	0	8 (%80)	0	<0,01
Hüresel İnfiltrasyon					
0 puan	10 (%100)	10 (%100)	0	4 (%40)	<0,01
1 puan	0	0	0	3 (%30)	<0,01
2 puan	0	0	3 (%30)	3 (%30)	<0,01
3 puan	0	0	7 (%70)	0	<0,01
Konjesyon					
0 puan	10 (%100)	10 (%100)	0	4 (%40)	<0,01
1 puan	0	0	0	3 (%30)	<0,01
2 puan	0	0	3 (%30)	3 (%30)	<0,01
3 puan	0	0	7 (%70)	0	<0,01

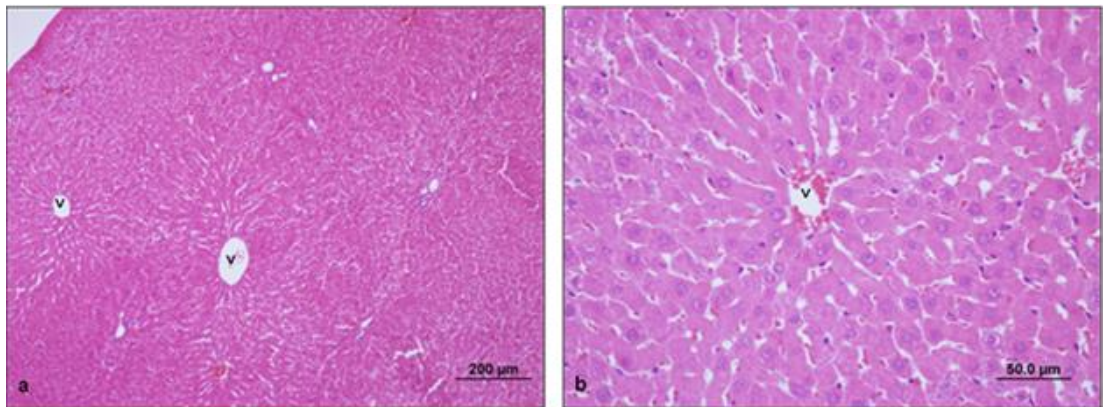
0 puan: hasar olmaması, 1 puan: az hasar olması, 2: orta düzeyde hasar olması, 3: şiddetli hasar

Karaciğer nekrotik hücre, sinüzoidal dilatasyon, hüresel infiltrasyon ve konjesyon değerlerinin L-ASP grubunda diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu saptandı ($p<0.01$) (Şekil 4.2).



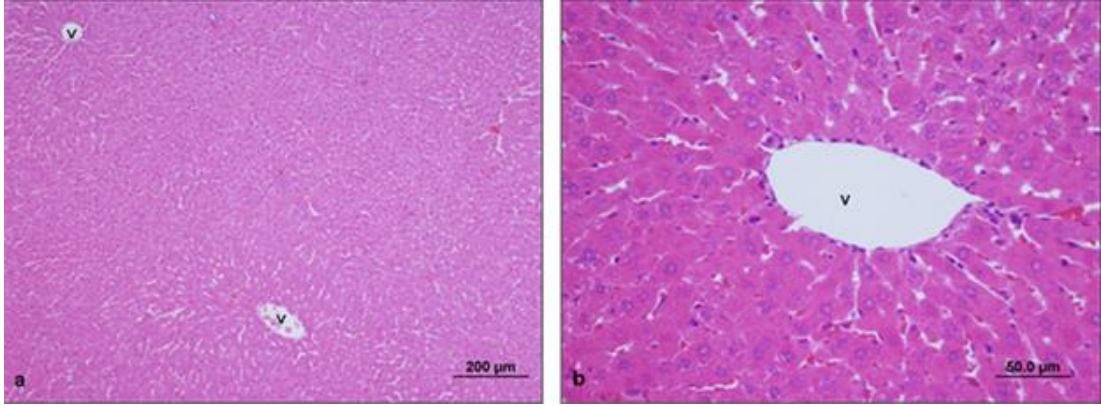
Şekil 4.2. Karaciğer dokusunda hasar skoru puan ortalaması

Mikroskopik incelemede kontrol ve NAC grubunda karaciğerin normal histolojik yapıda olduğu gözlenirken, L-ASP grubundaki hayvanların hepsinde orta ve şiddetli düzeyde hasar olduğu, L-ASP+NAC grubunda ise hiçbir hayvanda şiddetli hasar oluşmadığı ve histolojik değişikliklerin normale yakın olduğu gözlemlendi. Çalışma ve kontrol gruplarının karaciğer dokularının histopatolojik kesitleri şekil 4.3-6'da gösterildi.



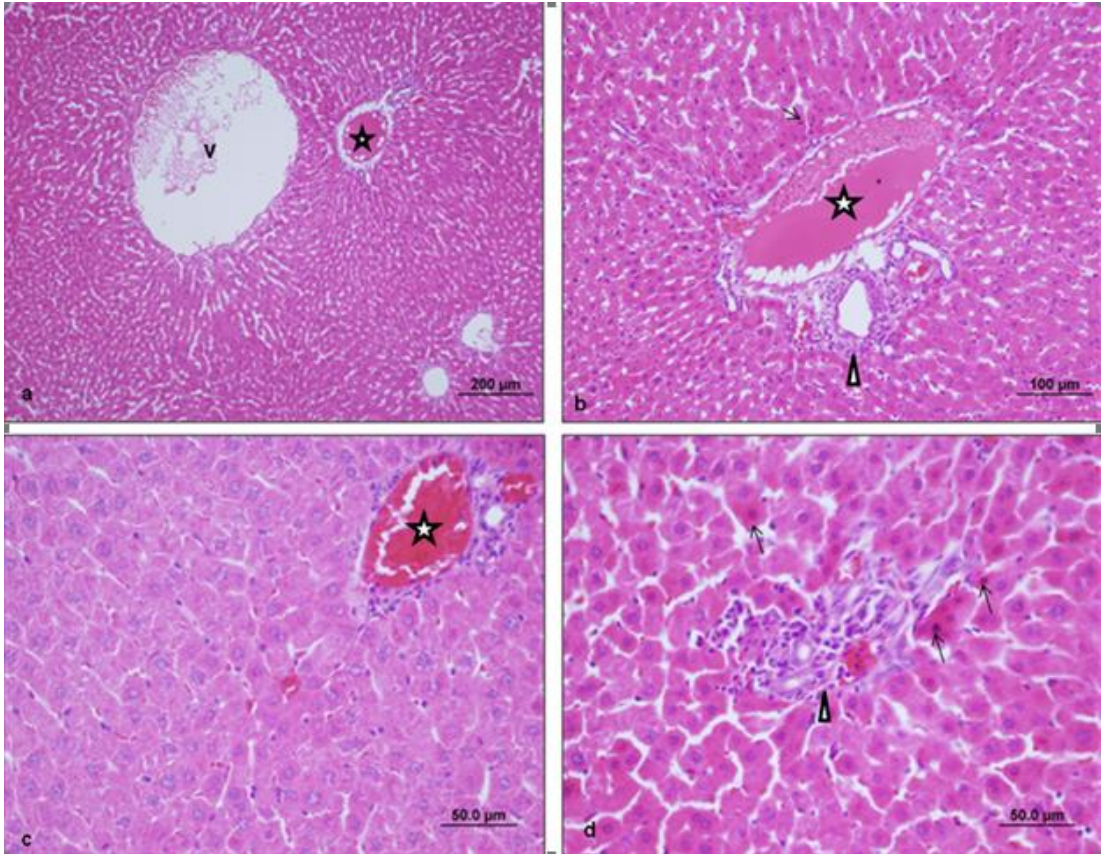
Hepatosit hücreleri, portal alan ve sinüzoidal yapıları ile normal histolojik yapıdaki karaciğer izlenmekte (v: vena sentralis) (a-b) (bar: 200 µm, bar: 50.0 µm, HE).

Şekil 4.3. Kontrol grubunun karaciğer kesitleri



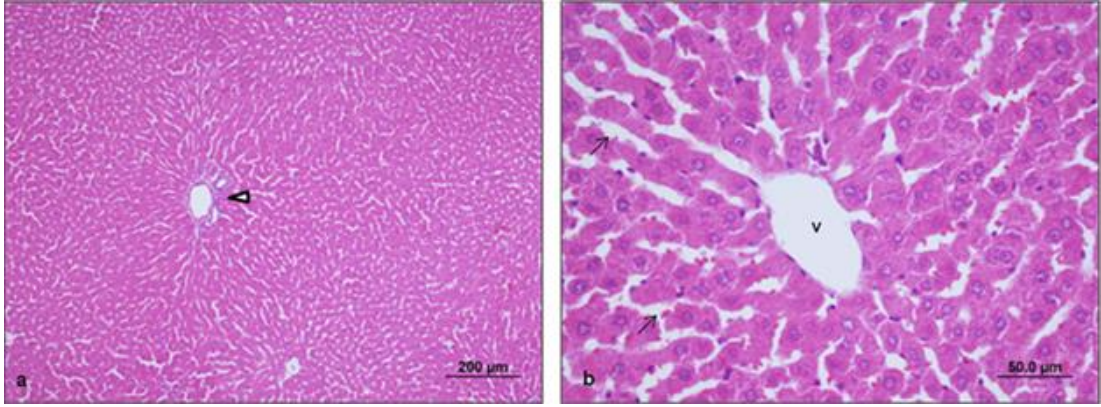
Hepatosit hücreleri, portal alan ve sinüzoidal yapıları ile normal histolojik yapıdaki karaciğer izlenmekte (v: vena sentralis) (a-b) (bar: 200 µm, bar: 50.0 µm, HE).

Şekil 4.4. NAC grubunun karaciğer kesitleri



Karaciğerin ışık mikroskopik incelenmesinde parankim dokuda hasar gözlenmekte. Piknotik nükleuslu eozinofilik sitoplazmalı nekrotik hepatosit hücreleri (→) ve dilate vena sentralis yapısı (v) görülmekte. Portal alanda ise hücrel infiltrasyon (▶) ve vasküler konjesyon (*) dikkat çekmekte (a-d) (bar: 200 µm, bar: 100 µm, bar: 50.0 µm, HE).

Şekil 4.5. L-ASP grubunun karaciğer kesitleri



Karaciğerin ışık mikroskopik incelenmesinde hasarın azaldığı dikkat çekmekte. Kısmi sinüzoidal dilatasyon (→) gözlemlense de parankim dokuda hepatosit hücreleri, vena sentralis yapısı (v), portal alan ve sinüzoidal yapıları ile normale yakın karaciğer yapısı gözlenmekte (a-b) (bar: 200 µm, bar: 50.0 µm, HE).

Şekil 4.6. L-ASP+NAC grubunun karaciğer kesitleri

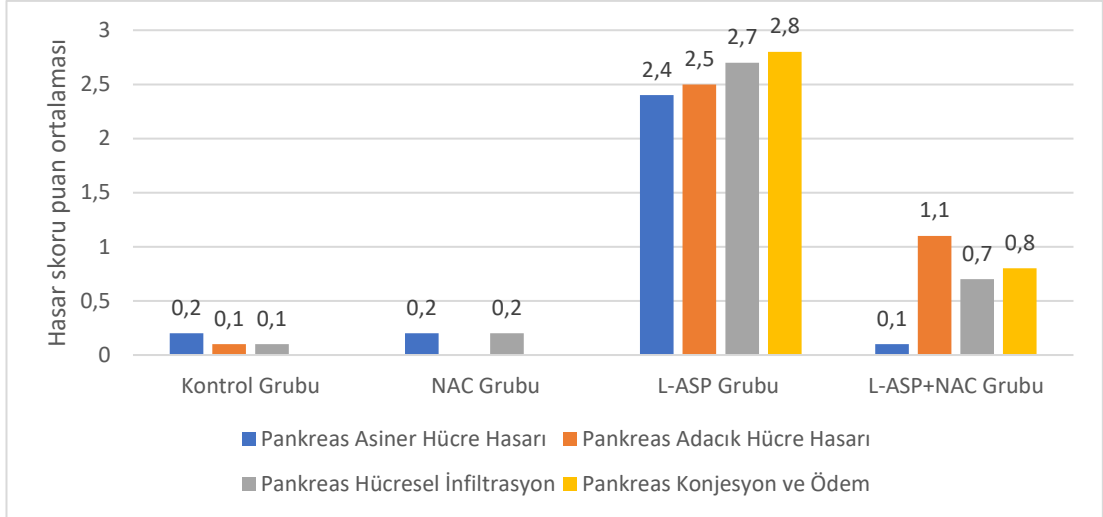
Pankreasın histolojik yapıları incelendiğinde; grup 1 ve 2’de ikişer sıçanda bir puan düzeyinde asiner hücre hasarı vardı, sekizer sıçan sağlıklıydı. Bu hasar grup 3’deki sıçanların altısında iki puanlık, dördünde üç puanlık düzeydeydi. Grup 4’de bir sıçanda bir puan düzeyinde asiner hücre hasarı varken dokuz sıçan da hasar yoktu. Grup 1’de bir sıçanda adacık hücre hasarı görüldü, dokuz sıçan normaldi. Grup 2’de hasar görülmedi. Grup 3’de beş sıçanda iki puan, beş sıçanda üç puan değerinde adacık hücre hasarı vardı. Grup 4’de beş sıçanda bir puan, üç sıçanda iki puan seviyesinde hasar vardı, iki sıçan da hasar görülmedi. Hücresel infiltrasyona bakıldığında grup 1’de sadece bir sıçanda bir puan düzeyinde hasar vardı, dokuz sıçan da hasar yoktu. Grup 2’de sekiz sıçan sağlıklıken iki sıçanda bir puan seviyesinde infiltrasyon vardı. Grup 3’de hasarsız sıçan hiç yoktu, üç sıçanda iki puan, yedi sıçanda üç puan düzeyinde hasar vardı. Grup 4’de üç sıçanda iki puan, iki sıçanda üç puan düzeyinde infiltrasyon varken beş sıçanda hasar yoktu. Konjesyon ve ödem grup 1 ve 2 ‘deki farelerin hiçbirinde yoktu. Grup 3’de iki sıçanda bir puanlık, sekiz sıçanda iki puanlık hasar vardı. Grup 4’de altı sıçanda bir puan, bir sıçanda iki puan seviyesinde hasar varken üç sıçanda konjesyon ve ödem görülmedi. Gruplar arasında asiner hücre hasarı, adacık hücre hasarı, hücresel infiltrasyon, konjesyon ve ödem skor dağılımları açısından istatistiksel açıdan anlamlı fark saptandı (Hepsi için $p<0,01$). Gruplar arasında pankreas doku hasarı skorlarının karşılaştırması tablo 4.5’de gösterildi.

Tablo 4.5. Gruplar arasında pankreas doku hasarı skorlarının karşılaştırması

	Grup-1 Kontrol grubu n(%)	Grup-2 NAC grubu n(%)	Grup-3 L-ASP grubu n(%)	Grup-4 L-ASP+NAC grubu n(%)	p değeri
Asiner Hücre					
Hasarı					
0 puan	8 (%80)	8 (%80)	0	9 (%90)	<0,01
1 puan	2 (%20)	2 (%20)	0	1 (%10)	<0,01
2 puan	0	0	6 (%60)	0	<0,01
3 puan	0	0	4 (%40)	0	<0,01
Adacık					
Hücre Hasarı					
0 puan	9 (%90)	10 (%100)	0	2 (%20)	<0,01
1 puan	1 (%10)	0	0	5 (%50)	<0,01
2 puan	0	0	5 (%50)	3 (%30)	<0,01
3 puan	0	0	5 (%50)	0	<0,01
Hüresel					
İnfiltrasyon					
0 puan	9 (%90)	8 (%80)	0	5 (%50)	<0,01
1 puan	1 (%10)	2 (20)	0	3 (%30)	<0,01
2 puan	0	0	3 (%30)	2 (%20)	<0,01
3 puan	0	0	7 (%70)	0	<0,01
Konjesyon ve					
Ödem					
0 puan	10 (%100)	10 (%100)	0	3 (%30)	<0,01
1 puan	0	0	2 (%20)	6 (%60)	<0,01
2 puan	0	0	8 (%80)	1 (%10)	<0,01
3 puan	0	0	0	0	<0,01

0 puan: hasar olmaması, 1 puan: az hasar olması, 2: orta düzeyde hasar olması, 3: şiddetli hasar

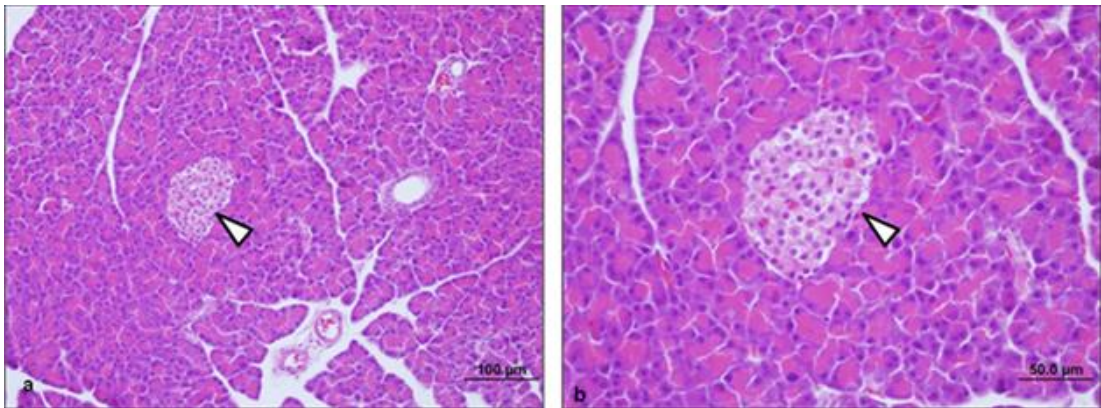
Pankreas asiner hücre hasarı, adacık hücre hasarı, hüresel infiltrasyon ile konjesyon ve ödem değerlerinin L-ASP grubunda diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu saptandı ($p<0.01$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Pankreas dokusunda hasar skoru puan ortalaması

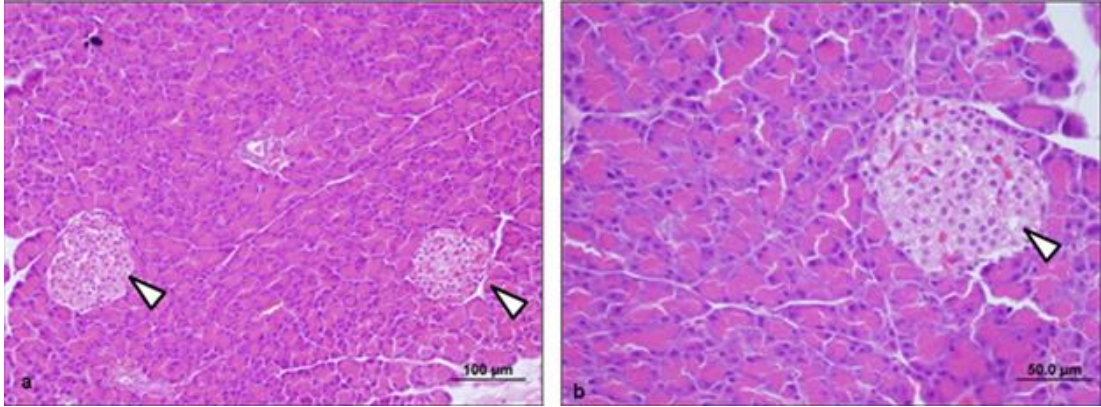
Mikroskopik incelemede kontrol ve NAC grubunda pankreasın normal histolojik yapıda olduğu gözlenirken, L-ASP grubundaki hayvanların hepsinde orta ve şiddetli düzeyde hasar olduğu, L-ASP+NAC grubunda ise hiçbir hayvanda şiddetli hasar oluşmadığı ve histolojik değişikliklerin normale yakın olduğu gözlemlendi.

L-ASP+NAC grubunda pankreas dokusunda hasar skoru puan ortalamasının toplamı (2,7 puan) karaciğer dokusundakine (2,3 puan) göre daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.2 ve şekil 4.7). Çalışma gruplarının pankreas dokularının histopatolojik kesitleri şekil 4.8-11’de gösterildi.



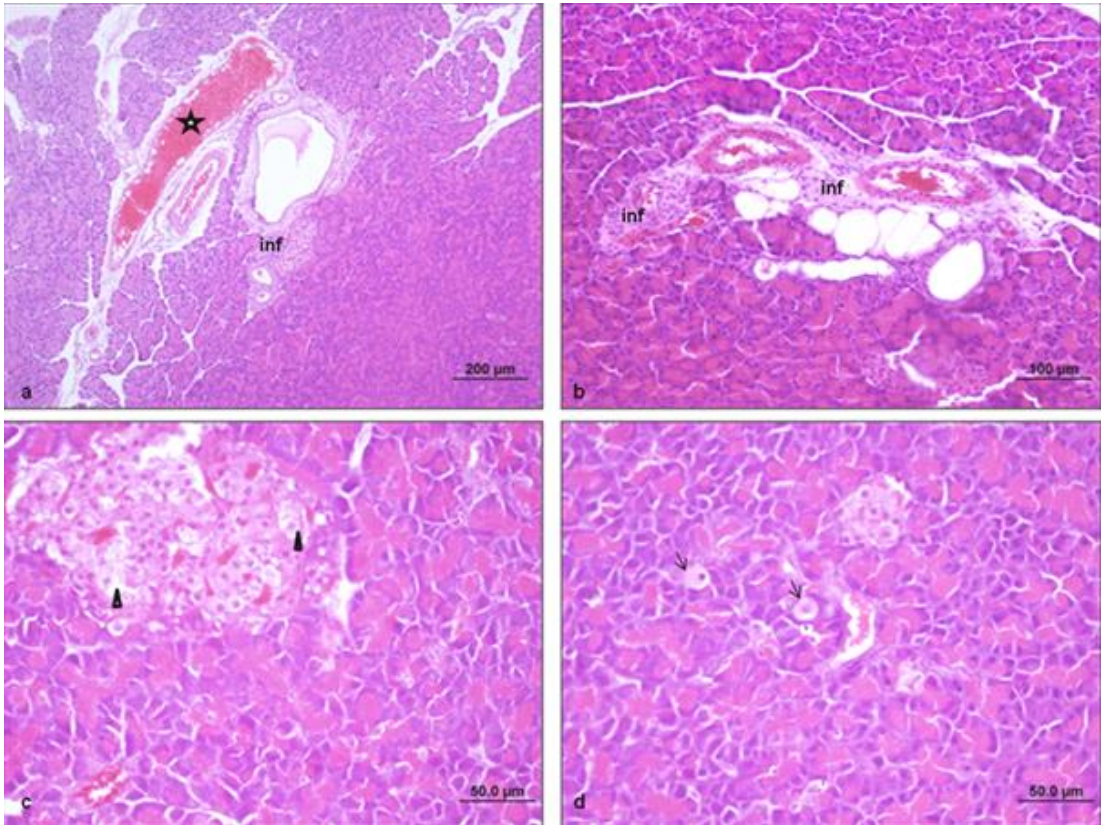
Endokrin (Langerhans adacıkları) (►) ve ekzokrin (asiner pankreas) bölgeleri ile normal histolojik yapıdaki pankreas izlenmekte (a-b) (bar: 100 µm, bar: 50.0 µm, HE).

Şekil 4.8. Kontrol grubunun pankreas kesitleri



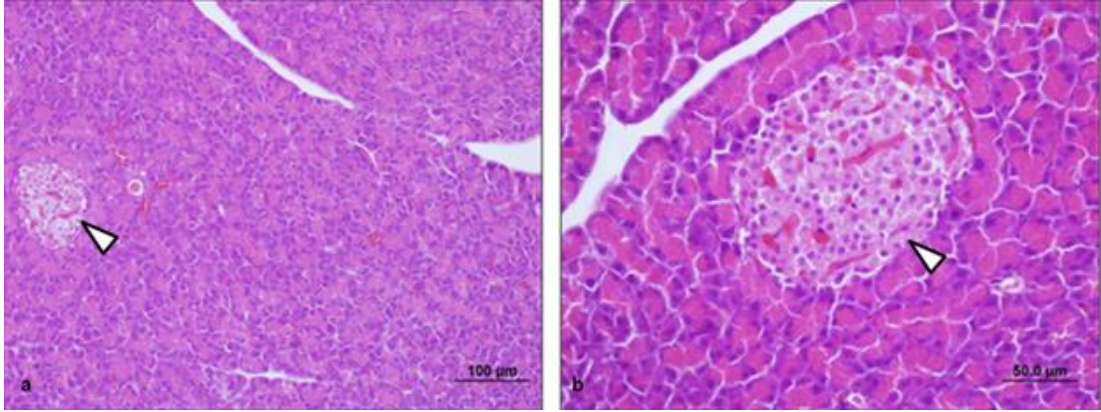
Endokrin (Langerhans adacıkları) (►) ve ekzokrin (asiner pankreas) bölgeleri ile normal histolojik yapıdaki pankreas izlenmekte (a-b) (bar: 100 µm, bar: 50.0 µm, HE).

Şekil 4.9. NAC grubunun pankreas kesitleri



Pankreasın ışık mikroskopik incelenmesinde parankim dokuda hasar gözlenmekte. Asiner hücrelerde (→) ve adacık hücrelerinde hasar (►) gözlenmekte. Ayrıca hüresel infiltrasyon (inf) ve ödem ile vasküler konjesyon (*) dikkat çekmekte (a-d) (bar: 200 µm, bar: 100 µm, bar: 50.0 µm, HE).

Şekil 4.10. L-ASP grubunun pankreas kesitleri



Pankreasın ışık mikroskopik incelenmesinde hasarın azalması dikkat çekmekte. Endokrin (Langerhans adacıkları) (►) ve ekzokrin (asiner pankreas) bölgeleri ile normale yakın histolojik yapıdaki pankreas izlenmekte (a-b) (bar: 100 µm, bar: 50.0 µm, HE).

Şekil 4.11. L-ASP+NAC grubunun pankreas kesitleri

5. TARTIŞMA

Asparaginazlar, ALL'de tedavi protokollerinin temel taşıdır ve pediatrik protokollerin çoğunda remisyon indüksiyonu ve yoğunlaştırma tedavisinde kullanılmaktadır (245). 1960'larda pediatrik tedavi protokollerine girdiğinden beri, hastaların hayatta kalma oranları kademeli olarak yaklaşık %95'e yükselmiştir (158). Önceki yıllarda asparaginaz toksisitesinin *E. coli* endotoksinine bağlı olduğu düşünülürken artık L-asparagin ve glutamin seviyelerindeki azalmaya sekonder protein sentezinin inhibisyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir (246). L-ASP'ın eliminasyon yarı ömrünün kısa olması ve hızlı klirensi, klinik etkinliğin sağlanabilmesi için yüksek dozda ve sık aralıklarla verilmesini gerektirmektedir (159, 160). Bu da ilaç ile ilişkili hepatotoksisite, pankreatit ve tromboz dahil olmak üzere toksik etkilerinin artmasına, bu yüzden de dozun gecikmesine veya tedavinin aksamasına sebep olabilmektedir (18).

E. coli L-ASP'ın hem insan hem de hayvanlarda karaciğer ve pankreas üzerine toksik etkileri belgelenmiştir. En sık bildirilen biyokimyasal anormallikler amilaz, AST, ALT, ALP, bilirubin ve TG yüksekliğidir. Bay ve arkadaşlarının L-ASP tedavisi alan ALL tanılı hastalarda yaptığı retrospektif incelemede, en sık görülen yan etkinin alerjik reaksiyonlar olduğu (%19,9), daha sonra sırası ile hipertrigliseridemi-hiperkolesterolemi (%9,4), hiperglisemi (8,2), pankreatit (%1,1), parotit (%1,1) ve tromboz (%1,1) olduğu bildirilmiştir (247). Akarsu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada olguların %11,9'unda alerjik reaksiyon, %11,9'unda hiperglisemi, %10,7'sinde hipertrigliseridemi geliştiğini bildirmişlerdir (248). Parsons ve arkadaşları yaptıkları çalışmada L-ASP alan hastalarda hipertrigliseridemi sıklığının %67 oranında olduğunu göstermiş, ancak TG düzeyi ile pankreatik toksisite arasında bir ilişki gösterememişlerdir. Ayrıca hipertrigliseridemi sıklığının kullanılan L-ASP türüne göre (*E. coli* ASP ve PEG-ASP) değişiklik göstermediğini bildirmişlerdir (249). Cremer ve arkadaşları, prednizon, vinkristin, daunorubisin ve L-ASP verilen (BFM 79) 18 çocuk hasta ile üç ilacı takiben tek başına L-ASP verilen (BFM 83) 14 çocuk hastayı karşılaştırdıkları çalışmalarında kemoterapiye başlamadan önce ve daha sonra haftalık aralıklarla yapılan serum lipid ölçümlerinde BFM 79 protokolü alanlarda total kolesterol, TG, şilomikron seviyelerindeki istatistiksel açıdan anlamlı artış olduğunu göstermişlerdir. Protokol BFM 83 alan çocuklarda ise L-ASP öncesinde aldıkları

kemoterapi sırasında TG ve şilomikron seviyelerinde anlamlı değişiklikler olmadığını, ancak L-ASP monoterapisi sırasında TG ve şilomikron düzeylerinin en yüksek seviyeye çıktığını göstermişlerdir (250). Bu bulgu L-ASP ile lipid metabolizması arasındaki ilişkiyi en iyi şekilde göstermektedir.

Pediyatrik protokollere uygun olarak sekiz döngüden oluşan (iki indüksiyon, dört konsolidasyon ve iki re-indüksiyonda toplam altı doz 2000 IU/m² PEG-asp) kemoterapi protokolü ile tedavi edilen 152 erişkin ALL hastasından 82'sinin 148 döngüsünde transaminazlarda grade 3-4 yükselme, 36'sının 49 döngüsünde grade 3-4 hiperbilirubinemi, 55'inin 123 döngüsünde TG'de grade 3-4 yükselme olduğu bildirilmiştir. Ayrıca 37 hastanın 46 döngüsünde pankreatit geliştiği, pankreatit ile TG değerleri arasında ilişki bulunmadığı bildirilmiştir (251). Christ ve arkadaşlarının PEG-ASP ve L-ASP kullanan ALL hastalarında yaptığı bir retrospektif çalışmada, PEG-ASP alanların %60'ında, L-ASP alanların ise %33'ünde grade 3-4 hepatotoksisite saptanmış. Hipertransaminezemi PEG-ASP grubunda %50, L-ASP grubunda %22; hiperbilirubinemi PEG-ASP grubunda %33, L-ASP grubunda %11 oranında görülmüştür (18). Plotka ve arkadaşları, ALL tedavisi gören 13 yaşındaki erkek hastada protokol II aşamasında deksametazon, vinkristin, doksorubisin ve PEG-ASP alırken amilaz, lipaz değerlerinin arttığını ve akut pankreatit tablosu geliştiğini ve insülin başlamayı gerektirecek kadar dirençli hiperglisemileri olduğunu bildirmişlerdir (252). Sahoo ve arkadaşlarının yayınladıkları olgu serisinde kombinasyon kemoterapisinin bir parçası olarak L-ASP verilen dört olguda L-ASP uygulamasını takiben 2-20 gün içerisinde hepatomegali ve transaminazlarda yükselme olduğunu, bu hastalardan üçünün kaybedildiğini, bir hastanın ise karaciğer hasarının geri dönüşümlü olduğunu bildirmişlerdir (183).

L-ASP'in hepatik ve pankreas toksisitesi üzerine yapılan bu ve diğer çalışmalar, ilacın toksik etkisini azaltmaya ve ortadan kaldırmaya yönelik tedaviler üzerine ilginin yoğunlaşmasına neden olmuştur. Lu ve arkadaşları, pre-B ALL tanısı alan 23 yaşındaki erkek hastanın indüksiyon tedavisi esnasında (25 mg/m² doksorubisin, 2 mg vinkristin, 2.500 U/m² PEG-ASP) serum bilirubin, AST, ALT ve ALP değerlerinde yükselme olduğunu ve çekilen bilgisayarlı tomografide karaciğerde yağlanma olduğunu göstermişler. Olası diğer sebepleri ekarte ettikten sonra ilaç toksisitesine yönelik olarak B vitamini kompleksi ve L-karnitin tedavi başladıktan

sonra değerlerin hızla normalde döndüğünü ve karaciğerdeki yağlanmanın gerilediğini göstermişlerdir (253). Özdemir ve arkadaşları yayınladıkları vaka sunumunda ALL tedavisi alan 2,5 yaşındaki erkek hastanın indüksiyon tedavisi sırasında (60 mg/m^2 prednizolon, $1,5 \text{ mg/m}^2$ vinkristin, 30 mg/m^2 daunorubisin ve 5.000 U/m^2 L-ASP içeren bir kombinasyon) şiddetli hepatik toksisite ve pankreatik toksisite geliştiğini intravenöz NAC ile düzelme sağladıklarını, tekrarlayan L-ASP uygulamalarında daha düşük şiddette hepatik toksisitenin tekrarladığını ve oral NAC ile düzelme sağladıklarını bildirmişlerdir (254).

Kaya ve arkadaşları, hayvan deneyi ile L-ASP toksik etkilerini azaltmada karnitinin etkinliğini belirlemeye çalışmışlardır. Bu deney için 32 erkek fare kullanılmış ve denekler dört gruba ayrılmıştır. Grup I'e (kontrol) salin, grup II'ye beş gün boyunca 500 mg/kg L-karnitin, grup III'e tek doz 10.000 U/kg *E. coli* ASP, grup IV'e ise beş gün boyunca 500 mg/kg L-karnitin ve ardından tek doz ASP enjekte edilmiştir. İlaç uygulamalarında sonra toplanan örneklerde ASP verilen grupta diğer gruplara kıyasla MDA, total sialik asit, glukoz ve TG seviyelerinin anlamlı derecede arttığı, GSH ve amilaz seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca GSH, MDA, total sialik asit, glukoz, TG ve amilaz düzeylerinin, ASP sonrası L-karnitin verilen grupta kontrol grubununkine yaklaştığı tespit edilmiştir. Histolojik incelemede yalnız ASP alan grupta asiner hücrelerin vakuoler dejenerasyonu, koagülatif nekroz, karışık enflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenirken ASP sonrası L-karnitin verilen grupta ise doku hasarında iyileşme olduğu gösterilmiştir (244).

Suzuki ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, sıçanlara 5 gün boyunca günde bir kez 200 U/kg , 500 U/kg ve 1000 U/kg dozlarında L-ASP vermişler, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece "L-ASP-1000" grubunda pankreatik-amilaz konsantrasyonunda yükselme olduğunu ancak bu artışın akut pankreatitte görülen seviyelere ulaşmadığını, kontrol grubu ile tedavi grubu arasında serum lipaz konsantrasyonunda anlamlı fark olmadığını göstermişlerdir. Işık mikroskopisinde "L-ASP-1000" grubunda histolojik değişikliklerin, hücre içi vakuolizasyon, ödem, hücre infiltrasyonu şeklinde olduğu, diğer gruplarda pankreas dokusunda histolojik bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (255). Liu ve arkadaşlarının yakın zamanda yapmış oldukları bir çalışmada farelere iki hafta boyunca haftada iki kez 1200 U/kg dozunda PEG-ASP verilmiş ve farelerde hiperbilirubinemi olup transaminet

olmamasına rağmen histolojik incelemede karaciğerde yağlanma olduğu gözlenmiştir (256). Shito ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada sıçanlara D-galaktozamin vererek fulminan hepatit tablosu oluşturmuşlar, enjeksiyondan sonra 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 ve 168. saatlerdeki kan tablosu incelendiğinde AST ve ALT değerlerindeki artışın 3. saat itibari ile başladığı ama pik seviyesine 36. saatte ulaştığı görülmüştür. TB değerleri ise ancak 24 saat sonra artmaya başlamıştır. Histolojik inceleme de ise 6. saat itibari ile hepatosellüler nekroz ve infiltrasyonlar gözlenmiştir, hücresel onarım ise ancak 72. saatten sonra görülmeye başlamıştır (257).

Biz çalışmamızda, L-ASP alan grupta biyokimyasal belirteçlere baktığımızda; diğer gruplara göre glukoz, AST, ALT, TB, DB, ALP, TG, kolesterol ve lipaz düzeylerinde farklılık saptamadık. Sadece L-ASP grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir amilaz yüksekliği mevcuttu. Karaciğer ve pankreas dokusundaki oksidatif stres parametrelerine baktığımızda; L-ASP alan grup ile diğer gruplar arasında MDA, GSH, CAT düzeyleri açısından farklılık saptamadık.

Biyokimyasal toksisite oluşturamamış olmamızı iki hipotez ile açıklayabiliriz. Bunlardan birisi verdiğimiz ilaç dozu, diğeri ise örnekleri toplama zamanı olabilir. L-ASP'ın organ toksisitesi ile ilgili literatürde sadece iki tane hayvan çalışması bulunmaktadır. Kaya ve arkadaşları (244) çalışmalarında 10.000 U/kg'dan tek doz L-ASP vermiş, 24 saat sonrasında örnekleri toplamışlar ve oksidatif stres belirteçleri, glukoz, TG düzeylerinde değişiklikler olduğunu, pankreas dokusunda da toksisitenin geliştiğini, ancak amilaz düzeyinde anlamlı yükselme olmadığını, karnitin ile organ hasarında iyileşme olduğunu göstermişlerdir. Bizim uyguladığımız doz ve örnekleri toplama aralığı aynı olmasına rağmen biyokimyasal belirteç ve oksidatif stres parametrelerinde değişiklik gösterememiş olmamız kullandığımız deney hayvanı türünün farklı olması ile açıklanabilir. Suzuki ve arkadaşları (255) ise L-ASP'ı 200, 500, 1000 U/kg'dan haftada beş gün verdiklerinde sadece 1000 U/kg dozunda alanlarda pankreatik toksisite ve amilaz düzeyinde yükselme olduğunu göstermişlerdir. Oysa ki çalışmamızda verdiğimiz toplam doz Suzuki ve arkadaşlarını verildiği dozdan iki kat fazla idi. Biyokimyasal belirteç ve oksidatif stres parametrelerinde değişiklik gösterememiş olmamızın diğer nedeni L-ASP'ın yarılanma ömrünün sıçanlarda kısa olması (yaklaşık olarak 90 dk.) olabilir (258). Çünkü; eliminasyon süresinin hızlı olması enzimlerin seyrini ve pik yapma süresini

değiştirecektir. Ayrıca yüksek ALT'nin zamanlaması değişkendir (259) ve bu nedenle yüksekliği tespit etmek için birçok periyodik test gerekebilir. Hücrelerde oluşan hasarın iyileşmesi biyokimyasal parametrelerin düzelmesinden daha uzun zaman aldığı için, organ hasarını tespit edebildiğimizi düşünüyoruz. Bu nedenle L-ASP'ın tekrarlayan dozlarda yapılmasının biyokimyasal toksisiteyi belirlememize daha etkili olabileceğini düşünüyoruz. Bizim sonuçlarımızdaki farkın, hasarın derecesi, boyutu ve karaciğerde başlayan rejenerasyondan kaynaklandığı varsayıldı.

Karaciğerin histopatolojik incelemesinde; hasarın derecesini belirlemek için kullanılan puanlama sistemi ile en yüksek puanların L-ASP alan grupta olduğu, L-ASP+NAC alan grupta ise hasar derecesinin puan dağılımında belirgin şekilde azalma olduğu gösterildi (Tablo 4.4). Mikroskopik incelemede ise kontrol grubunun karaciğer dokusu normal histolojik yapıda iken, L-ASP grubunda karaciğer parankiminin hasarlı, hepatositlerin nekrotik görünümde olduğu, vena sentralisin genişlediği, portal alanın hücrel infiltrasyona uğradığı ve vasküler yapılarda konjesyon olduğu görüldü. L-ASP sonrası NAC alan grupta parankimal hasarın azalmış, kısmi sinüzoidal dilatasyonlar gözlenirse de hepatosit hücreleri, vena sentralis, portal alan ve sinüzoidal yapıları normale yakın yapıda izlendi.

Pankreasın histopatolojik incelemesinde; en yüksek puanların L-ASP alan grupta olduğu, L-ASP+NAC alan grupta ise hasar derecesinin puan dağılımında belirgin şekilde azalma olduğu gösterildi (Tablo 4.5). Mikroskopik incelemede ise kontrol grubunun pankreas dokusunun normal histolojik yapıda olduğu görüldü. L-ASP grubunun ışık mikroskopik incelenmesinde parankim dokuda hasar gözlemlendi. Asiner hücrelerde ve adacık hücrelerinde hasar, hücrel infiltrasyon ve ödem ile vasküler konjesyon dikkat çekti. L-ASP+NAC grubunun incelemesinde parankimdeki hasarın azaldığı, endokrin ve ekzokrin bölgelerin normale yakın histolojik yapıda olduğu izlendi.

Asparaginazın neden olduğu hepatik toksisite en sık transaminazlarda ve bilirubinde asemptomatik artışlara sebep olsa da Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi histolojik hasarla paralel seyretmemektedir (256). L-ASP ile indüklenen hepatik toksisitenin kesin mekanizması bilinmemektedir. Hem protein sentezindeki azalma hem de şiddetli steatoz gelişimi ile ilişkili görünmektedir. Steatoz karaciğer biyopsisi yapılan hastaların %50-90'ında belgelenmiştir. Ayrıca L-ASP'ın

bir dereceye kadar hepatosit nekrozuna yol açtığı, ancak steatozdan daha az belirgin olduğu da gözlenmiştir (183). Hepatik steatozun, asparagin ve glutaminin hücre içinde tükenmesi ve mitokondride beta oksidasyonun bozulması ile ilişkili ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (260, 261). Glutamin yoksunluğu, normal hücrelerin asparagin tükenmesinin toksik etkilerinden kaçtığı biyosentetik yolu engelleyebilir. Bozulmuş mitokondriyal beta oksidasyonunda ise serbest yağ asitleri metabolize edilemez, laktat ve reaktif oksijen radikalleri daha da artar ve birikir. Birikmiş radikaller, hücrelerde ve aerobik metabolizmada bozulmaya neden olan ve buna bağlı olarak laktik asidoz ve trigliserit birikimine neden olan mitokondriyal DNA hasarına yol açar. Sonuç, hücre içi steatozdur (262). Bir çalışma, farelerin, *Wolinella süksinogen* kökenli glutaminaz içermeyen ASP ile uzun bir süre boyunca tedavisinin, hepatotoksik olmadığını bildirmiştir (263).

Akut pankreatitin deneysel modellerinde, asiner hücrelerde zimojen granüllerinin birikmesini başlatan olay olarak salgılanmanın engellenmesi öne sürülmüştür. Bu olayı, vakuoller içinde sindirim enzimler ile lizozomal hidrolazın lokalizasyonu ve enzimlerin aktivasyonunu takiben akut hücre içi zedelenmesi izler. Pankreas asiner hücrelerinde zimojen proteazın aktivasyonunun, akut pankreatit gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (264, 265). Çalışmamızda serum amilaz ve lipaz konsantrasyonları önemli ölçüde artmadığı halde asiner hücre hasarının olmasının sebebi, bu hücrelerdeki zimojen granüllerinden sindirim enzimlerinin ekzositozunun engellenmesi olabilir. Yaptığımız histolojik incelemedeki zimojen içeren vakuollerdeki morfolojik değişim, deneysel pankreatitin erken evresinde görülene benzerdi. Serum pankreas enzimleri hafifçe artmış, ancak akut pankreatitte görülen seviyeye ulaşmamıştır.

Önceki çalışmalar, NAC'ın, alkolik olmayan steatohepatit hastalarında lipid peroksidasyonunu azalttığını ve hepatik glutatyondaki azalmayı ılımlı hale getirdiğini bildirmiştir (266, 267). Baumgardner ve arkadaşları, NAC'ın, alkolik olmayan steatohepatit tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunu ortadan kaldıran, hepatik glutatyonun azalmasını artıran, TNF-alfa üretimini inhibe eden ve enflamasyonu azaltan, böylece hepatosit hasarını önemli ölçüde azaltan etkili bir hepatik antioksidan olduğunu göstermiştir (266). Lipid hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda önemli bir aracı olarak bilinen GSH ve CAT ile lipid peroksidasyonunda MDA seviyeleri,

oksidatif stres açısından bir gösterge olabilir. Çalışmamız, oksijen kaynaklı serbest radikallerin, farelerde asparaginaz kaynaklı karaciğer ve pankreatik hasarının patogenezindeki rolünü tam olarak ortaya koyamasa da daha önce yapılan çalışmalar bunu göstermiştir (244).

Toksisitenin ne kadar sürede klinik bulgu vereceği, klinik bulgu oluşmayan hastaların takibinin hangi aralıklarla yapılması gerektiği, koruyucu tedavinin gerekliliği ya da hangi hasta grubunda tercih edileceği ve diğer olası yan etkileri açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamızın bu alanda yapılacak yeni çalışmalara yol göstereceğini düşünüyoruz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- Bu çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, TİCAM'dan temin edilen "Wistar-albino" türü 40 erkek sıçan kullanıldı.
- 2- Sıçanların ortalama ağırlıkları $261,58 \pm 31,49$ (min-mak: 200-310) gram olup çalışma boyunca ölen hayvan olmadı.
- 3- Biyokimyasal parametreler incelendiğinde glukoz, AST, ALT, TB, DB, ALP, TG, kolesterol ve lipaz düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gösterilemedi ($p > 0,05$, hepsi için).
- 4- L-ASP grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan amilaz yüksekliği mevcuttu ($p > 0,05$).
- 5-Gruplar arasında karaciğer ve pankreas dokusundaki MDA, CAT, GSH düzeyleri açısından farklılık yoktu ($p > 0,05$, hepsi için).
- 6- Histolojik incelemede karaciğer nekrotik hücre, sinüzoidal dilatasyon, hücresel infiltrasyon ve konjesyon değerlerinin L-ASP grubunda diğer gruplara nazaran anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. NAC+L-ASP grubunda ise hasar düzeyi anlamlı şekilde azaldı ($p < 0.01$, hepsi için).
- 7- Pankreas asiner hücre hasarı, hücresel, adacık hücre hasarı ile konjesyon ve ödem değerlerinin L-ASP grubunda diğer gruplara nazaran anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. NAC+L-ASP grubunda ise hasar düzeyi anlamlı şekilde azaldı ($p < 0.01$, hepsi için).
- 8- Mikroskopik incelemede kontrol ve NAC grubunda karaciğer ve pankreas normal histolojik yapıda iken, L-ASP grubundaki hayvanların hepsinde orta ve şiddetli düzeyde hasar vardı. NAC+L-ASP grubunda ise hiçbir hayvanda şiddetli hasar görülmedi, normale yakın histolojik değişiklikler mevcuttu.
- 9- Çalışmamızda L-ASP'ın AST, ALT değerlerinde yükseklik olmadan karaciğer toksisitesi; lipaz ve amilaz yüksekliği olmadan pankreas toksisitesi oluşturduğu görülmüştür. NAC ise bu toksisiteyi büyük oranda geri döndürebilmiştir.
- 10- L-ASP alan hastalar karaciğer ve pankreas toksisitesi açısından yakından izlenmelidir.
- 11- L-ASP toksisitesine NAC'ın etkisi ile ilgili klinik veriler çok azdır, bu konunun aydınlanabilmesi için hayvan modellerinde ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.

12- Bu çalışmada her ne kadar L-ASP'ın karaciğer ve pankreas üzerinde yaptığı biyokimyasal toksisiteyi gösterememiş olsak da histolojik incelemelerde L-ASP'ın doku düzeyinde önemli hasar oluşturduğu, NAC'ın ise bu hasarı önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Davis AS, Viera AJ, Mead MD. Leukemia: an overview for primary care. *Am Fam Physician*. 2014;89(9):731-8.
2. William LC, Teena B. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Philip L, Jeffrey ML, Jonathan DF, editors. *Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. 6th ed. New York, Academic Press. 2016;367-88.
3. Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux S. Nathan And Oski's Hematology and Oncology Of Infancy And Childhood. 8th ed. London, United Kingdom: Elsevier Health Sciences. 2015;1527-54
4. Conter V, Rizzari C, Sala A, Chiesa R, Citterio M, Biondi A. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Riccardo R, editor. *Orphanet Encyclopedia*. 2004;41-53.
5. Puckett Y, Chan O. Cancer, Acute Lymphocytic Leukemia (ALL) [Updated 2019 Mar 31]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459149/>
6. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(3):193-203.
7. Wartenberg D, Groves FD, Adelman AS. Acute Lymphoblastic Leukemia: Epidemiology and Etiology. In: Estey EH, Faderl S, Kantarjian H, editors. *Acute Leukemias*. Berlin, Heidelberg: Springer. 2008;77-93.
8. Kutluk MT, Yesilipek A, Group TPO, Society TPH. Turkish National Pediatric Cancer Registry 2002-2008 (Turkish Pediatric Oncology Group and Turkish Pediatric Hematology Society). *J Clin Oncol*. 2013;31(Suppl 15):10067.
9. Kutluk MT, Yesilipek A. Pediatric cancer registry Turkey: 2009-2016 (Pediatric Oncology Group & Turkish Pediatric Hematology Society). 2017;35(Suppl 15):22015.
10. Farber S, Diamond LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med*. 1948;238(23):787-93.

11. Moghrabi A, Levy DE, Asselin B, Barr R, Clavell L, Hurwitz C, et al. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007;109(3):896-904.
12. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. 2004;104(9):2690-6.
13. Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A, et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. *Cancer*. 2011;117(2):238-49.
14. Haskell CM, Canellos GP, Leventhal BG, Carbone PP, Serpick AA, Hansen HH. L-asparaginase toxicity. *Cancer Res*. 1969;29(4):974-5.
15. Avramis VI, Tiwari PN. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(3):241-54.
16. Pieters R, Appel I, Kuehnel HJ, Tetzlaff-Fohr I, Pichlmeier U, van der Vaart I, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy, and safety of a new recombinant asparaginase preparation in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: a randomized phase 2 clinical trial. *Blood*. 2008;112(13):4832-8.
17. Piatkowska-Jakubas B, Krawczyk-Kulis M, Giebel S, Adamczyk-Cioch M, Czyz A, Lech Maranda E, et al. Use of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: recommendations of the Polish Adult Leukemia Group. *Pol Arch Med Wewn*. 2008;118(11):664-9.
18. Christ TN, Stock W, Knoebel RW. Incidence of asparaginase-related hepatotoxicity, pancreatitis, and thrombotic events in adults with acute lymphoblastic leukemia treated with a pediatric-inspired regimen. *J Oncol Pharm Pract*. 2018;24(4):299-308.
19. Hijiya N, van der Sluis IM. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(4):748-57.

20. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.* 1999;49(2):91-102.
21. Zimmerman JJ. Redox/radical repertoire rapport: pathophysiology and therapeutics. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1998;42(1):1-3.
22. Yokoyama C, Sueyoshi Y, Ema M, Mori Y, Takaishi K, Hisatomi H. Induction of oxidative stress by anticancer drugs in the presence and absence of cells. *Oncol Lett.* 2017;14(5):6066-70.
23. Cadeddu C, Piras A, Mantovani G, Deidda M, Dessi M, Madeddu C, et al. Protective effects of the angiotensin II receptor blocker telmisartan on epirubicin-induced inflammation, oxidative stress, and early ventricular impairment. *Am Heart J.* 2010;160(3):487 e1-7.
24. Fang J, Nakamura H, Iyer AK. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target.* 2007;15(7-8):475-86.
25. Yamada T, Egashira N, Imuta M, Yano T, Yamauchi Y, Watanabe H, et al. Role of oxidative stress in vinorelbine-induced vascular endothelial cell injury. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(1):120-7.
26. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(17):7915-22.
27. Sardesai VM. Role of antioxidants in health maintenance. *Nutr Clin Pract.* 1995;10(1):19-25.
28. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
29. Mokhtari V, Afsharian P, Shahhoseini M, Kalantar SM, Moini A. A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine. *Cell J.* 2017;19(1):11-7.
30. Piller G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol.* 2001;112(2):282-92.
31. Ortiz-Hidalgo C. Notas sobre la historia de la leucemia. *Patología.* 2013;51:58-89.

32. Hajdu SI. A note from history: The discovery of blood cells. *Ann Clin Lab Sci*. 2003;33(2):237-8.
33. Thomas X. Highlights in the history of leukaemia: a historical review from the beginnings to current therapeutic developments. *Haema*. 2006;9:191-211.
34. Barry L, editor. *Leukemia: A Research Report*: DIANE Publishing. 1993;15-34.
35. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-8.
36. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985;103(3):460-2.
37. Jabbour EJ, Faderl S, Kantarjian HM. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Mayo Clin Proc*. 2005;80(11):1517-27.
38. Hewitt M, Weiner SL, Simone JV. *Childhood Cancer Survivorship: Improving Care and Quality of Life*. Washington (DC): National Academies Press (US). 2003;1-224.
39. Bathia S, Robinson L. Epidemiology of leukemia in childhood. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and childhood. *Nathan And Oski's Hematology and Oncology Of Infancy And Childhood*. 8th ed. London, United Kingdom: Elsevier Health Sciences. 2003;1081-100.
40. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010*. Bethesda, Md: National Cancer Institute; April 2013.
41. Kinlen L. Infections and immune factors in cancer: the role of epidemiology. *Oncogene*. 2004;23(38):6341-8.
42. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson genetics in medicine*. Eighth edition. ed. Philadelphia: Elsevier; 2016;1-546.

43. Andersen MK, Christiansen DH, Pedersen-Bjergaard J. Centromeric breakage and highly rearranged chromosome derivatives associated with mutations of TP53 are common in therapy-related MDS and AML after therapy with alkylating agents: an M-FISH study. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;42(4):358-71.
44. Kumar N, Kumar R. Nanomedicine for Cancer Treatment. *Nanotechnology and nanomaterials in the treatment of life-threatening diseases: nanomedicine, diagnostics and drug delivery*. 2014;177-246.
45. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-43.
46. Heim S. Boveri at 100: Boveri, chromosomes and cancer. *The Journal of pathology*. 2014;234(2):138-41.
47. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, Loudin MG, Liu W, Zhang J, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009;41(11):1243-6.
48. Roganovic J. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. In: Guenova M, Balatzenko G, editors. *Leukemia*. Rijeka: IntechOpen; 2013;39-74.
49. Messinger YH, Gaynon PS, Sposto R, van der Giessen J, Eckroth E, Malvar J, et al. Bortezomib with chemotherapy is highly active in advanced B-precursor acute lymphoblastic leukemia: Therapeutic Advances in Childhood Leukemia & Lymphoma (TACL) Study. *Blood*. 2012;120(2):285-90.
50. Shalapour S, Zelmer A, Pfau M, Moderegger E, Costa-Blechs Schmidt C, van Landeghem FK, et al. The thalidomide analogue, CC-4047, induces apoptosis signaling and growth arrest in childhood acute lymphoblastic leukemia cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2006;12(18):5526-32.
51. Tan M, Fong R, Lo M, Young R. Lenalidomide and secondary acute lymphoblastic leukemia: a case series. *Hematol Oncol*. 2017;35(1):130-4.

52. Miniero R, Barisone E, Vivenza C, Brach del Prever A, Besenon L, Cordero di Montezemolo L, et al. Acute lymphoblastic leukemia in a girl treated for osteosarcoma. *Pediatr Hematol Oncol*. 1995;12(2):185-8.
53. Mahoney MC, Moysich KB, McCarthy PL, Jr., McDonald RC, Stepanenko VF, Day RW, et al. The Chernobyl childhood leukemia study: background & lessons learned. *Environ Health*. 2004;3(1):12.
54. Ron E. Ionizing radiation and cancer risk: evidence from epidemiology. *Pediatr Radiol*. 2002;32(4):232-44.
55. Sali D, Cardis E, Sztanyik L, Auvinen A, Bairakova A, Dontas N, et al. Cancer consequences of the Chernobyl accident in Europe outside the former USSR: a review. *Int J Cancer*. 1996;67(3):343-52.
56. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect*. 2007;115(1):138-45.
57. Shu XO, Reaman GH, Lampkin B, Sather HN, Pendergrass TW, Robison LL. Association of paternal diagnostic X-ray exposure with risk of infant leukemia. Investigators of the Childrens Cancer Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3(8):645-53.
58. Shu XO, Potter JD, Linet MS, Severson RK, Han D, Kersey JH, et al. Diagnostic X-rays and ultrasound exposure and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia by immunophenotype. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(2):177-85.
59. Ahlbom A, Day N, Feychting M, Roman E, Skinner J, Dockerty J, et al. A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer*. 2000;83(5):692-8.
60. Greenland S, Sheppard AR, Kaune WT, Poole C, Kelsh MA. A pooled analysis of magnetic fields, wire codes, and childhood leukemia. Childhood Leukemia-EMF Study Group. *Epidemiology*. 2000;11(6):624-34.
61. Kleinerman RA, Kaune WT, Hatch EE, Wacholder S, Linet MS, Robison LL, et al. Are children living near high-voltage power lines at increased risk of

- acute lymphoblastic leukemia? American journal of epidemiology. 2000;151(5):512-5.
62. Linet MS, Hatch EE, Kleinerman RA, Robison LL, Kaune WT, Friedman DR, et al. Residential exposure to magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med.* 1997;337(1):1-7.
 63. Vianna NJ, Kovaszny B, Polan A, Ju C. Infant leukemia and paternal exposure to motor vehicle exhaust fumes. *J Occup Med.* 1984;26(9):679-82.
 64. Pesticides in the Diets of Infants and Children. Washington (DC)1993.
 65. Zahm SH, Ward MH. Pesticides and childhood cancer. *Environ Health Perspect.* 1998;106 Suppl 3:893-908.
 66. Ma X, Buffler PA, Gunier RB, Dahl G, Smith MT, Reinier K, et al. Critical windows of exposure to household pesticides and risk of childhood leukemia. *Environ Health Perspect.* 2002;110(9):955-60.
 67. Menegaux F, Baruchel A, Bertrand Y, Lescoeur B, Leverger G, Nelken B, et al. Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukaemia. *Occup Environ Med.* 2006;63(2):131-4.
 68. Shu XO, Ross JA, Pendergrass TW, Reaman GH, Lampkin B, Robison LL. Parental alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of infant leukemia: a Childrens Cancer Group study. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(1):24-31.
 69. Brondum J, Shu XO, Steinbuch M, Severson RK, Potter JD, Robison LL. Parental cigarette smoking and the risk of acute leukemia in children. *Cancer.* 1999;85(6):1380-8.
 70. Robison LL, Buckley JD, Daigle AE, Wells R, Benjamin D, Arthur DC, et al. Maternal drug use and risk of childhood nonlymphoblastic leukemia among offspring. An epidemiologic investigation implicating marijuana (a report from the Childrens Cancer Study Group). *Cancer.* 1989;63(10):1904-11.
 71. Greaves M. Childhood leukaemia. *BMJ.* 2002;324(7332):283-7.
 72. Greaves MF, Alexander FE. An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood? *Leukemia.* 1993;7(3):349-60.

73. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):975-83.
74. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Imbach P, Kühne T, Arceci RJ, editors. *Pediatric Oncology, A Comprehensive Guide*. 3 ed: Springer International Publishing; 2014. p. 5-20.
75. Greaves MF. Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. *Science*. 1986;234(4777):697-704.
76. Lanzkowsky P. *Lanzkowsky's manual of pediatric hematology and oncology*. Boston, MA: Elsevier; 2016;367-88.
77. Pui CH, Behm FG, Singh B, Rivera GK, Schell MJ, Roberts WM, et al. Myeloid-associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. *Blood*. 1990;75(1):198-202.
78. Pui CH, Rubnitz JE, Hancock ML, Downing JR, Raimondi SC, Rivera GK, et al. Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1998;16(12):3768-73.
79. Baruchel A, Cayuela JM, Ballerini P, Landman-Parker J, Cezard V, Firat H, et al. The majority of myeloid-antigen-positive (My+) childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias express TEL-AML1 fusion transcripts. *Br J Haematol*. 1997;99(1):101-6.
80. Hirsch-Ginsberg C, Childs C, Chang KS, Beran M, Cork A, Reuben J, et al. Phenotypic and molecular heterogeneity in Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. *Blood*. 1988;71(1):186-95.
81. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*. 1999;17(12):3835-49.

82. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
83. Ingram LC, Fairclough DL, Furman WL, Sandlund JT, Kun LE, Rivera GK, et al. Cranial nerve palsy in childhood acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer*. 1991;67(9):2262-8.
84. Kataoka A, Shimizu K, Matsumoto T, Shintaku N, Okuno T, Takahashi Y, et al. Epidural spinal cord compression as an initial symptom in childhood acute lymphoblastic leukemia: rapid decompression by local irradiation and systemic chemotherapy. *Pediatr Hematol Oncol*. 1995;12(2):179-84.
85. Hijiya N, Liu W, Sandlund JT, Jeha S, Razzouk BI, Ribeiro RC, et al. Overt testicular disease at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: lack of therapeutic role of local irradiation. *Leukemia*. 2005;19(8):1399-403.
86. Sirvent N, Suciu S, Bertrand Y, Uyttebroeck A, Lescoeur B, Otten J. Overt testicular disease (OTD) at diagnosis is not associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the EORTC CLG Study 58881. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;49(3):344-8.
87. Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, Chessells JM, Baruchel A, Kamps W, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet*. 2002;359(9321):1909-15.
88. Rogalsky RJ, Black GB, Reed MH. Orthopaedic manifestations of leukemia in children. *J Bone Joint Surg Am*. 1986;68(4):494-501.
89. Jones OY, Spencer CH, Bowyer SL, Dent PB, Gottlieb BS, Rabinovich CE. A multicenter case-control study on predictive factors distinguishing childhood leukemia from juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatrics*. 2006;117(5):e840-4.
90. Ribeiro RC, Pui CH, Schell MJ. Vertebral compression fracture as a presenting feature of acute lymphoblastic leukemia in children. *Cancer*. 1988;61(3):589-92.

91. Halton JM, Atkinson SA, Fraher L, Webber C, Gill GJ, Dawson S, et al. Altered mineral metabolism and bone mass in children during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *J Bone Miner Res.* 1996;11(11):1774-83.
92. Schachat AP, Markowitz JA, Guyer DR, Burke PJ, Karp JE, Graham ML. Ophthalmic manifestations of leukemia. *Arch Ophthalmol.* 1989;107(5):697-700.
93. Guyer DR, Schachat AP, Vitale S, Markowitz JA, Braine H, Burke PJ, et al. Leukemic retinopathy. Relationship between fundus lesions and hematologic parameters at diagnosis. *Ophthalmology.* 1989;96(6):860-4.
94. Schwartz CL, Miller NR, Wharam MD, Leventhal BG. The optic nerve as the site of initial relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 1989;63(8):1616-20.
95. Ribeiro RC, Pui CH. The clinical and biological correlates of coagulopathy in children with acute leukemia. *J Clin Oncol.* 1986;4(8):1212-8.
96. Hunger SP. Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. *Blood.* 1996;87(4):1211-24.
97. Kong SG, Seo JH, Jun SE, Lee BK, Lim YT. Childhood acute lymphoblastic leukemia with hyperleukocytosis at presentation. *Blood Res.* 2014;49(1):29-35.
98. Nelken RP, Stockman JA, 3rd. The hypereosinophilic syndrome in association with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr.* 1976;89(5):771-3.
99. Hogan TF, Koss W, Murgu AJ, Amato RS, Fontana JA, VanScoy FL. Acute lymphoblastic leukemia with chromosomal 5;14 translocation and hypereosinophilia: case report and literature review. *J Clin Oncol.* 1987;5(3):382-90.
100. Hendrickson WA, Ward KB. Atomic models for the polypeptide backbones of myohemerythrin and hemerythrin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975;66(4):1349-56.

101. Hann IM, Evans DI, Marsden HB, Jones PM, Palmer MK. Bone marrow fibrosis in acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *J Clin Pathol.* 1978;31(4):313-5.
102. Eguiguren JM, Pui CH. Bone marrow necrosis and thrombotic complications in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol.* 1992;20(1):58-60.
103. Ma H, Sun H, Sun X. Survival improvement by decade of patients aged 0-14 years with acute lymphoblastic leukemia: a SEER analysis. *Sci Rep.* 2014;4:4227.
104. Patte C, Auperin A, Michon J, Behrendt H, Leverger G, Frappaz D, et al. The Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. *Blood.* 2001;97(11):3370-9.
105. Schrappe M. Evolution of BFM trials for childhood ALL. *Ann Hematol.* 2004;83(Suppl 1):121-3.
106. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 1996;14(1):18-24.
107. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood.* 2007;109(3):926-35.
108. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017;7(6):e577.
109. Gottlieb AJ, Weinberg V, Ellison RR, Henderson ES, Terebelo H, Rafla S, et al. Efficacy of daunorubicin in the therapy of adult acute lymphocytic leukemia: a prospective randomized trial by cancer and leukemia group B. *Blood.* 1984;64(1):267-74.

110. Scavino HF, George JN, Sears DA. Remission induction in adult acute lymphocytic leukemia. Use of vincristine and prednisone alone. *Cancer*. 1976;38(2):672-7.
111. Burger B, Zimmermann M, Mann G, Kuhl J, Loning L, Riehm H, et al. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *J Clin Oncol*. 2003;21(2):184-8.
112. Larson RA, Dodge RK, Burns CP, Lee EJ, Stone RM, Schulman P, et al. A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 8811. *Blood*. 1995;85(8):2025-37.
113. Rowe JM, Buck G, Burnett AK, Chopra R, Wiernik PH, Richards SM, et al. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*. 2005;106(12):3760-7.
114. Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL, Cortes J, Giles FJ, Beran M, et al. Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2000;18(3):547-61.
115. Hurwitz CA, Silverman LB, Schorin MA, Clavell LA, Dalton VK, Glick KM, et al. Substituting dexamethasone for prednisone complicates remission induction in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2000;88(8):1964-9.
116. Jones B, Freeman AI, Shuster JJ, Jacquillat C, Weil M, Pochedly C, et al. Lower incidence of meningeal leukemia when prednisone is replaced by dexamethasone in the treatment of acute lymphocytic leukemia. *Med Pediatr Oncol*. 1991;19(4):269-75.
117. Silverman LB, Gelber RD, Young ML, Dalton VK, Barr RD, Sallan SE. Induction failure in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Cancer*. 1999;85(6):1395-404.

118. Oudot C, Auclerc MF, Levy V, Porcher R, Piguet C, Perel Y, et al. Prognostic factors for leukemic induction failure in children with acute lymphoblastic leukemia and outcome after salvage therapy: the FRALLE 93 study. *J Clin Oncol*. 2008;26(9):1496-503.
119. Schrappe M, Hunger SP, Pui CH, Saha V, Gaynon PS, Baruchel A, et al. Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(15):1371-81.
120. Narayanan S, Shami PJ. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;81(1):94-102.
121. Balduzzi A, Valsecchi MG, Uderzo C, De Lorenzo P, Klingebiel T, Peters C, et al. Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. *Lancet*. 2005;366(9486):635-42.
122. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*. 2010;24(2):265-84.
123. Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Trigg ME, Cherlow JM, Lukens JN, et al. Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. *N Engl J Med*. 1998;338(23):1663-71.
124. Arico M, Valsecchi MG, Conter V, Rizzari C, Pession A, Messina C, et al. Improved outcome in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia defined by prednisone-poor response treated with double Berlin-Frankfurt-Muenster protocol II. *Blood*. 2002;100(2):420-6.
125. Silverman LB, Stevenson KE, O'Brien JE, Asselin BL, Barr RD, Clavell L, et al. Long-term results of Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985-2000). *Leukemia*. 2010;24(2):320-34.

126. Balis FM, Holcenberg JS, Poplack DG, Ge J, Sather HN, Murphy RF, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral methotrexate and mercaptopurine in children with lower risk acute lymphoblastic leukemia: a joint children's cancer group and pediatric oncology branch study. *Blood*. 1998;92(10):3569-77.
127. Schmiegelow K, Schroder H, Gustafsson G, Kristinsson J, Glomstein A, Salmi T, et al. Risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is related to RBC methotrexate and mercaptopurine metabolites during maintenance chemotherapy. Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology. *J Clin Oncol*. 1995;13(2):345-51.
128. Riccardi R, Balis FM, Ferrara P, Lasorella A, Poplack DG, Mastrangelo R. Influence of food intake on bioavailability of oral 6-mercaptopurine in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 1986;3(4):319-24.
129. Schmiegelow K, Glomstein A, Kristinsson J, Salmi T, Schroder H, Bjork O. Impact of morning versus evening schedule for oral methotrexate and 6-mercaptopurine on relapse risk for children with acute lymphoblastic leukemia. Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO). *J Pediatr Hematol Oncol*. 1997;19(2):102-9.
130. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(23):2001-8.
131. Erb N, Harms DO, Janka-Schaub G. Pharmacokinetics and metabolism of thiopurines in children with acute lymphoblastic leukemia receiving 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1998;42(4):266-72.
132. Adamson PC, Poplack DG, Balis FM. The cytotoxicity of thioguanine vs mercaptopurine in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 1994;18(11):805-10.

133. Stork LC, Matloub Y, Broxson E, La M, Yanofsky R, Sather H, et al. Oral 6-mercaptopurine versus oral 6-thioguanine and veno-occlusive disease in children with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: report of the Children's Oncology Group CCG-1952 clinical trial. *Blood*. 2010;115(14):2740-8.
134. Vora A, Mitchell CD, Lennard L, Eden TO, Kinsey SE, Lilleyman J, et al. Toxicity and efficacy of 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine in childhood lymphoblastic leukaemia: a randomised trial. *Lancet*. 2006;368(9544):1339-48.
135. Pinkel D, Hernandez K, Borella L, Holton C, Aur R, Samoy G, et al. Drug dosage and remission duration in childhood lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1971;27(2):247-56.
136. Evans AE, Gilbert ES, Zandstra R. The increasing incidence of central nervous system leukemia in children. (Children's Cancer Study Group A). *Cancer*. 1970;26(2):404-9.
137. Schouten H. *Blood: Principles and Practice of Hematology*, 2nd edition. *Annals of Oncology*. 2004;15(8):1301-.
138. Balis FM, Poplack DG. Central nervous system pharmacology of antileukemic drugs. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1989;11(1):74-86.
139. Frei E, 3rd. Curative cancer chemotherapy. *Cancer Res*. 1985;45(12 Pt 1):6523-37.
140. Rivera GK, Pinkel D, Simone JV, Hancock ML, Crist WM. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. 30 years' experience at St. Jude Children's Research Hospital. *N Engl J Med*. 1993;329(18):1289-95.
141. Pauly M, Silverman LB. Diagnosis and Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Wiernik P, Dutcher J, Gertz M, editors. *Neoplastic Diseases of the Blood*: Springer, Cham.; 2018.
142. Balis FM, Lester CM, Chrousos GP, Heideman RL, Poplack DG. Differences in cerebrospinal fluid penetration of corticosteroids: possible relationship to the prevention of meningeal leukemia. *J Clin Oncol*. 1987;5(2):202-7.

143. Frick J, Ritch PS, Hansen RM, Anderson T. Successful treatment of meningeal leukemia using systemic high-dose cytosine arabinoside. *J Clin Oncol.* 1984;2(5):365-8.
144. Wang JJ, Freeman AI, Sinks LF. Treatment of acute lymphocytic leukemia by high-dose intravenous methotrexate. *Cancer Res.* 1976;36(4):1441-4.
145. Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Gajjar AJ, Sandlund JT, Harrison PL, et al. Cerebrospinal fluid asparagine concentrations after *Escherichia coli* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 1999;17(5):1568-73.
146. Kafkewitz D, Bendich A. Enzyme-induced asparagine and glutamine depletion and immune system function. *Am J Clin Nutr.* 1983;37(6):1025-30.
147. Keating MJ, Holmes R, Lerner S, Ho DH. L-asparaginase and PEG asparaginase--past, present, and future. *Leuk Lymphoma.* 1993;10 Suppl:153-7.
148. Yadav S, Verma SK, Singh J, Kumar A. Industrial Production and Clinical Application of L-Asparaginase: A Chemotherapeutic Agent. *International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering.* 2014;8.
149. Dolowy WC, Henson D, Cornet J, Sellin H. Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase. Study of mice with lymphoma and normal monkeys and report on a child with leukemia. *Cancer.* 1966;19(12):1813-9.
150. Hill JM, Roberts J, Loeb E, Khan A, MacLellan A, Hill RW. L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. Remission in human leukemia. *JAMA.* 1967;202(9):882-8.
151. Clarkson B, Krakoff I, Burchenal J, Karnofsky D, Golbey R, Dowling M, et al. Clinical results of treatment with *E. coli* L-asparaginase in adults with leukemia, lymphoma, and solid tumors. *Cancer.* 1970;25(2):279-305.
152. Crowther D. L-asparaginase and human malignant disease. *Nature.* 1971;229(5281):168-71.

153. Oettgen HF, Old LJ, Boyse EA, Campbell HA, Philips FS, Clarkson BD, et al. Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Res.* 1967;27(12):2619-31.
154. Ortega JA, Nesbit ME, Jr., Donaldson MH, Hittle RE, Weiner J, Karon M, et al. L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 1977;37(2):535-40.
155. Pession A, Valsecchi MG, Masera G, Kamps WA, Magyarosy E, Rizzari C, et al. Long-term results of a randomized trial on extended use of high dose L-asparaginase for standard risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2005;23(28):7161-7.
156. Sallan SE, Gelber RD, Kimball V, Donnelly M, Cohen HJ. More is better! Update of Dana-Farber Cancer Institute/Children's Hospital childhood acute lymphoblastic leukemia trials. *Haematol Blood Transfus.* 1990;33:459-66.
157. Amylon MD, Shuster J, Pullen J, Berard C, Link MP, Wharam M, et al. Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia.* 1999;13(3):335-42.
158. Poplack DG, Reaman G. Acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Pediatr Clin North Am.* 1988;35(4):903-32.
159. Capizzi RL, Bertino JR, Skeel RT, Creasey WA, Zanes R, Olayon C, et al. L-asparaginase: clinical, biochemical, pharmacological, and immunological studies. *Ann Intern Med.* 1971;74(6):893-901.
160. Kawashima K, Takeshima H, Higashi Y, Hamaguchi M, Sugie H, Imamura I, et al. High efficacy of monomethoxypolyethylene glycol-conjugated L-asparaginase (PEG2-ASP) in two patients with hematological malignancies. *Leuk Res.* 1991;15(6):525-30.
161. Evans WE, Tsiatis A, Rivera G, Murphy SB, Dahl GV, Denison M, et al. Anaphylactoid reactions to *Escherichia coli* and *Erwinia* asparaginase in children with leukemia and lymphoma. *Cancer.* 1982;49(7):1378-83.

162. Park YK, Abuchowski A, Davis S, Davis F. Pharmacology of Escherichia coli-L-asparaginase polyethylene glycol adduct. *Anticancer Res.* 1981;1(6):373-6.
163. Wang B, Relling MV, Storm MC, Woo MH, Ribeiro R, Pui CH, et al. Evaluation of immunologic crossreaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. *Leukemia.* 2003;17(8):1583-8.
164. Capizzi RL. Asparaginase revisited. *Leuk Lymphoma.* 1993;10 Suppl:147-50.
165. Ho DH, Brown NS, Yen A, Holmes R, Keating M, Abuchowski A, et al. Clinical pharmacology of polyethylene glycol-L-asparaginase. *Drug Metab Dispos.* 1986;14(3):349-52.
166. Plourde PV, Jeha S, Hijiya N, Keller FG, Silverman LB, Rheingold SR, et al. Safety profile of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* in a large compassionate-use trial. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(7):1232-8.
167. Raetz EA, Salzer WL. Tolerability and efficacy of L-asparaginase therapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010;32(7):554-63.
168. Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, et al. Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2000;18(7):1525-32.
169. Shinnick SE, Browning ML, Koontz SE. Managing hypersensitivity to asparaginase in pediatrics, adolescents, and young adults. *J Pediatr Oncol Nurs.* 2013;30(2):63-77.
170. Avramis VI, Avramis EV, Hunter W, Long MC. Immunogenicity of native or pegylated *E. coli* and *Erwinia* asparaginases assessed by ELISA and surface plasmon resonance (SPR-biacore) assays of IgG antibodies (Ab) in sera from patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Anticancer Res.* 2009;29(1):299-302.

171. Asselin BL, Whitin JC, Coppola DJ, Rupp IP, Sallan SE, Cohen HJ. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. *J Clin Oncol.* 1993;11(9):1780-6.
172. Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, Sather H, Bostrom BC, Cohen LJ, et al. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood.* 2002;99(6):1986-94.
173. Strullu M, Corradini N, Audrain M, Orsonneau JL, Bouige D, Thomare P, et al. Silent hypersensitivity to *Escherichia coli* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2010;51(8):1464-72.
174. Fabry U, Korholz D, Jurgens H, Gobel U, Wahn V. Anaphylaxis to L-asparaginase during treatment for acute lymphoblastic leukemia in children--evidence of a complement-mediated mechanism. *Pediatr Res.* 1985;19(4):400-8.
175. Liu C, Kawedia JD, Cheng C, Pei D, Fernandez CA, Cai X, et al. Clinical utility and implications of asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2012;26(11):2303-9.
176. Panosyan EH, Seibel NL, Martin-Aragon S, Gaynon PS, Avramis IA, Sather H, et al. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004;26(4):217-26.
177. Kamisaki Y, Wada H, Yagura T, Matsushima A, Inada Y. Reduction in immunogenicity and clearance rate of *Escherichia coli* L-asparaginase by modification with monomethoxypolyethylene glycol. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981;216(2):410-4.
178. Oettgen HF, Stephenson PA, Schwartz MK, Leeper RD, Tallai L, Tan CC, et al. Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. *Cancer.* 1970;25(2):253-78.

179. Ohnuma T, Holland JF, Freeman A, Sinks LF. Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man. *Cancer Res.* 1970;30(9):2297-305.
180. Pratt CB, Simone JV, Zee P, Aur RJ, Johnson WW. Comparison of daily versus weekly L-asparaginase for the treatment of childhood acute leukemia. *J Pediatr.* 1970;77(3):474-83.
181. Pratt CB, Johnson WW. Duration and severity of fatty metamorphosis of the liver following L-asparaginase therapy. *Cancer.* 1971;28(2):361-4.
182. Biggs JC, Chesterman CN, Holliday J. L-asparaginase--clinical experience in leukaemia, lymphoma and carcinoma. *Aust N Z J Med.* 1971;1(1):1-7.
183. Sahoo S, Hart J. Histopathological features of L-asparaginase-induced liver disease. *Semin Liver Dis.* 2003;23(3):295-9.
184. Al-Nawakil C, Willems L, Mauprivez C, Laffy B, Benm'rad M, Tamburini J, et al. Successful treatment of l-asparaginase-induced severe acute hepatotoxicity using mitochondrial cofactors. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(7):1670-4.
185. Bodmer M, Sulz M, Stadlmann S, Droll A, Terracciano L, Krahenbuhl S. Fatal liver failure in an adult patient with acute lymphoblastic leukemia following treatment with L-asparaginase. *Digestion.* 2006;74(1):28-32.
186. Paquette JC, Guerin PJ, Gauthier ER. Rapid induction of the intrinsic apoptotic pathway by L-glutamine starvation. *J Cell Physiol.* 2005;202(3):912-21.
187. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood.* 2001;97(5):1211-8.
188. Sahu S, Saika S, Pai SK, Advani SH. L-asparaginase (Leunase) induced pancreatitis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 1998;15(6):533-8.
189. Weetman RM, Baehner RL. Latent onset of clinical pancreatitis in children receiving L-asparaginase therapy. *Cancer.* 1974;34(3):780-5.

190. Alvarez OA, Zimmerman G. Pegaspargase-induced pancreatitis. *Med Pediatr Oncol.* 2000;34(3):200-5.
191. Garrington T, Bensard D, Ingram JD, Silliman CC. Successful management with octreotide of a child with L-asparaginase induced hemorrhagic pancreatitis. *Med Pediatr Oncol.* 1998;30(2):106-9.
192. Knoderer HM, Robarge J, Flockhart DA. Predicting asparaginase-associated pancreatitis. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;49(5):634-9.
193. Wu SF, Chen AC, Peng CT, Wu KH. Octreotide therapy in asparaginase-associated pancreatitis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;51(6):824-5.
194. Kearney SL, Dahlberg SE, Levy DE, Voss SD, Sallan SE, Silverman LB. Clinical course and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia and asparaginase-associated pancreatitis. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;53(2):162-7.
195. Carpentieri U, Balch MT. Hyperglycemia associated with the therapeutic use of L-asparaginase: possible role of insulin receptors. *J Pediatr.* 1978;93(5):775-8.
196. Lavine RL, Brodsky I, Garofano CD, Rose LI. The effect of E. coli L-asparaginase on oral glucose tolerance and insulin release in man. *Diabetologia.* 1978;15(2):113-6.
197. Turner GR, Marks JF, Buchanan GR. Relative hyperglucagonemia in L-asparaginase-and prednisone-induced glucose intolerance in management of acute lymphocytic leukemia. *Clin Pediatr (Phila).* 1983;22(5):363-7.
198. Pui CH, Burghen GA, Bowman WP, Aur RJ. Risk factors for hyperglycemia in children with leukemia receiving L-asparaginase and prednisone. *J Pediatr.* 1981;99(1):46-50.
199. Roberson JR, Raju S, Shelso J, Pui CH, Howard SC. Diabetic ketoacidosis during therapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;50(6):1207-12.

200. Athale UH, Chan AK. Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: part I. Epidemiology of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Thromb Res.* 2003;111(3):125-31.
201. Payne JH, Vora AJ. Thrombosis and acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2007;138(4):430-45.
202. Homans AC, Rybak ME, Baglini RL, Tiarks C, Steiner ME, Forman EN. Effect of L-asparaginase administration on coagulation and platelet function in children with leukemia. *J Clin Oncol.* 1987;5(5):811-7.
203. Casonato A, Lazzaro AR, Rosolen A, Girolami A. Factor VIII/von Willebrand factor abnormalities during L-asparaginase treatment in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Haematol.* 1988;80(4):190-3.
204. Barbui T, Finazzi G, Vigano S, Mannucci PM. L-asparaginase lowers protein C antigen. *Thromb Haemost.* 1984;52(2):216.
205. Domenech C, Thomas X, Chabaud S, Baruchel A, Gueyffier F, Mazingue F, et al. l-asparaginase loaded red blood cells in refractory or relapsing acute lymphoblastic leukaemia in children and adults: results of the GRASPALL 2005-01 randomized trial. *Br J Haematol.* 2011;153(1):58-65.
206. Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Gunawardena R, Rahbari-Oskoui F. Increased oxidative stress in younger as well as in older humans. *Clin Chim Acta.* 2003;328(1-2):83-6.
207. Przekwas M, Malgorzewicz S, Zdrojewski Z, Debska-Slizien A, Lysiak-Szydłowska W, Rutkowski B. Influence of predialysis oxidative stress on peroxidation processes after renal transplantation. *Transplant Proc.* 2003;35(6):2170-3.
208. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002;30(6):620-50.
209. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yonden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations.* 2015;6(3):331-336.

210. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.
211. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 1999;424(1-2):83-95.
212. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology.* 2002;181-182:219-22.
213. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186:407-21.
214. Pryor WA. On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free Radic Biol Med.* 1989;7(2):177-8.
215. Yau TM. Mutagenicity and cytotoxicity of malonaldehyde in mammalian cells. *Mech Ageing Dev.* 1979;11(2):137-44.
216. Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31426-33.
217. Siu GM, Draper HH, Valli VE. Oral toxicity of malonaldehyde: a 90-day study on mice. *J Toxicol Environ Health.* 1983;11(1):105-19.
218. National Toxicology P. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Malonaldehyde, Sodium Salt (3-Hydroxy-2-propenal, Sodium Salt) (CAS No. 24382-04-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* 1988;331:1-182.
219. Marnett LJ. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Sci Publ.* 1999(150):17-27.
220. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(12):1685-96.
221. Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2000;43(5):550-7.

222. Slatter DA, Avery NC, Bailey AJ. Identification of a new cross-link and unique histidine adduct from bovine serum albumin incubated with malondialdehyde. *J Biol Chem.* 2004;279(1):61-9.
223. Halliwell B. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Soc Symp.* 1995;61:73-101.
224. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1974;41(0):35-97.
225. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001;54(3):176-86.
226. Yang MS, Chan HW, Yu LC. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology.* 2006;226(2-3):126-30.
227. Deneke SM. Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Regul.* 2000;36:151-80.
228. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32(8):595-603.
229. Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother.* 1988;42(8):513-9.
230. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev.* 1998;3(2):114-27.
231. De Vries N, De Flora S. N-acetyl-L-cysteine. *J Cell Biochem Suppl.* 1993;17F:270-7.
232. De Caro L, Ghizzi A, Costa R, Longo A, Ventresca GP, Lodola E. Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung.* 1989;39(3):382-6.
233. Borgstrom L, Kagedal B, Paulsen O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1986;31(2):217-22.
234. Olsson B, Johansson M, Gabrielsson J, Bolme P. Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *Eur J Clin Pharmacol.* 1988;34(1):77-82.

235. Issels RD, Nagele A, Eckert KG, Wilmanns W. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. *Biochem Pharmacol.* 1988;37(5):881-8.
236. De Flora S, Bennicelli C, Camoirano A, Serra D, Romano M, Rossi GA, et al. In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis.* 1985;6(12):1735-45.
237. Nakata K, Kawase M, Ogino S, Kinoshita C, Murata H, Sakaue T, et al. Effects of age on levels of cysteine, glutathione and related enzyme activities in livers of mice and rats and an attempt to replenish hepatic glutathione level of mouse with cysteine derivatives. *Mech Ageing Dev.* 1996;90(3):195-207.
238. Hoffer E, Baum Y, Tabak A, Taitelman U. N-acetylcysteine increases the glutathione content and protects rat alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 1996;84(1):7-12.
239. Corcoran GB, Wong BK. Role of glutathione in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by N-acetyl-L-cysteine in vivo: studies with N-acetyl-D-cysteine in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986;238(1):54-61.
240. Pratt S, Ioannides C. Mechanism of the protective action of n-acetylcysteine and methionine against paracetamol toxicity in the hamster. *Arch Toxicol.* 1985;57(3):173-7.
241. Pastor A, Collado PS, Almar M, Gonzalez-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol.* 1997;27(2):363-70.
242. Wagner PD, Mathieu-Costello O, Bebout DE, Gray AT, Natterson PD, Glennow C. Protection against pulmonary O₂ toxicity by N-acetylcysteine. *Eur Respir J.* 1989;2(2):116-26.
243. Baier JE, Neumann HA, Moeller T, Kissler M, Borchardt D, Ricken D. [Radiation protection through cytokine release by N-acetylcysteine]. *Strahlenther Onkol.* 1996;172(2):91-8.

244. Kaya I, Cıtil M, Sozmen M, Karapehlivan M, Cigsar G. Investigation of protective effect of L-carnitine on L-asparaginase-induced acute pancreatic injury in male Balb/c mice. *Dig Dis Sci*. 2015;60(5):1290-6.
245. Pieters R, den Boer ML, Durian M, Janka G, Schmiegelow K, Kaspers GJ, et al. Relation between age, immunophenotype and in vitro drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia-implications for treatment of infants. *Leukemia*. 1998;12(9):1344-8.
246. Weiss RB. Hypersensitivity reactions. *Semin Oncol*. 1992;19(5):458-77.
247. Bay AB, Öner AF, Cesur Y, Demir C, Mukul Y, Açıkgöz M. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi Olgularında L-Asparajinaz'a Bağlı Toksikite. *Van Tıp Dergisi*. 2005;12:149-52.
248. Akarsu S, Yılmaz E, Aygün AD, Gözdağoğlu S. L-asparaginase therapy and complications in children with acute lymphoblastic leukemia. 2004;39(4):162-70.
249. Parsons SK, Skapek SX, Neufeld EJ, Kuhlman C, Young ML, Donnelly M, et al. Asparaginase-associated lipid abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1997;89(6):1886-95.
250. Cremer P, Lakomek M, Beck W, Prindull G. The effect of L-asparaginase on lipid metabolism during induction chemotherapy of childhood lymphoblastic leukaemia. *Eur J Pediatr*. 1988;147(1):64-7.
251. Aldoss I, Douer D, Behrendt CE, Chaudhary P, Mohrbacher A, Vrona J, et al. Toxicity profile of repeated doses of PEG-asparaginase incorporated into a pediatric-type regimen for adult acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol*. 2016;96(4):375-80.
252. Plotka A, Wziatek A, Wachowiak J, Derwich K. Successful Management of a Child With Drug-induced Necrotizing Pancreatitis During Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy: A Case Report. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2019 Mar;41(2):e125-e128.

253. Lu G, Karur V, Herrington JD, Walker MG. Successful treatment of pegaspargase-induced acute hepatotoxicity with vitamin B complex and L-carnitine. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2016;29(1):46-7.
254. Ozdemir ZC, Turhan AB, Eren M, Bor O. Is N-acetylcysteine infusion an effective treatment option in L-asparaginase associated hepatotoxicity? *Blood Res*. 2017;52(1):69-71.
255. Suzuki M, Shimizu T, Kudo T, Shoji H, Ohtsuka Y, Yamashiro Y. Octreotide prevents L-asparaginase-induced pancreatic injury in rats. *Exp Hematol*. 2008;36(2):172-80.
256. Liu Y, Janke LJ, Li L, Relling MV. L-carnitine does not ameliorate asparaginase-associated hepatotoxicity in a C57BL6 mouse model. *Leuk Lymphoma*. 2019:1-3.
257. Shito M, Balis UJ, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. A fulminant hepatic failure model in the rat: involvement of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Dig Dis Sci*. 2001;46(8):1700-8.
258. Putter J. Pharmacokinetic behavior of L-asparaginase in men and in animals. *Recent Results Cancer Res*. 1970;33:64-74.
259. Senior JR. Monitoring for hepatotoxicity: what is the predictive value of liver "function" tests? *Clin Pharmacol Ther*. 2009;85(3):331-4.
260. Woods JS, Handschumacher RE. Hepatic homeostasis of plasma L-asparagine. *Am J Physiol*. 1971;221(6):1785-90.
261. Zimmerman HJ. Hepatotoxicity : the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999;1-789.
262. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci*. 2002;65(2):166-76.
263. Durden DL, Salazar AM, Distasio JA. Kinetic analysis of hepatotoxicity associated with antineoplastic asparaginases. *Cancer Res*. 1983;43(4):1602-5.

264. Boquist L. Morphologic effects of ethionine on the pancreas of the Chinese hamster. A light and electron microscopic study of degenerative changes. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1969;76(1):91-105.
265. Saito I, Hashimoto S, Saluja A, Steer ML, Meldolesi J. Intracellular transport of pancreatic zymogens during caerulein supramaximal stimulation. *Am J Physiol.* 1987;253(4 Pt 1):G517-26.
266. Baumgardner JN, Shankar K, Hennings L, Albano E, Badger TM, Ronis MJ. N-acetylcysteine attenuates progression of liver pathology in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr.* 2008;138(10):1872-9.
267. Samuhasaneeto S, Thong-Ngam D, Kulaputana O, Patumraj S, Klaikeaw N. Effects of N-acetylcysteine on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *J Med Assoc Thai.* 2007;90(4):788-97.

