

---

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Dragana S. Aleksić

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ VREDNOSTI  
HOMOCISTEINA, FOLNE KISELINE I  
VITAMINA B<sub>12</sub> U KRVI KOD DECE SA  
MALIGNIM BOLESTIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

---

---

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Dragana S. Aleksić

**PROGNOSTIC IMPORTANCE OF  
HOMOCYSTEINE, FOLIC ACID AND  
VITAMIN B<sub>12</sub> IN CHILDHOOD  
MALIGNANCY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

---

---

---

Mentor: Prof.dr Dragan M. Đurić, Medicinski fakultet Univerziteta u  
Beogradu

Komentor: Prof.dr Ivana Golubičić, Medicinski fakultet Univerziteta u  
Beogradu

Članovi komisije:

1. Prof.dr Radovan Bogdanović, Medicinski fakultet Univerziteta u  
Beogradu
2. Doc.dr Danica Jovanović, Medicinski fakultet Univerziteta u  
Beogradu
3. Prof.dr Gordana Kostić, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

## PROGNOSTIČKI ZNAČAJ VREDNOSTI HOMOCISTEINA, FOLNE KISELINE I VITAMINA B<sub>12</sub> U KRVI KOD DECE SA MALIGNIM BOLESTIMA

### REZIME

**Uvod:** Hiperhomocisteinemija je udružena sa karcinogenezom. Istraživanja hiperhomocisteinemije i maligniteta u dečjem uzrastu su malobrojna i nedovoljna da se donesu jasni zaključci o mogućem značaju homocisteina u ovoj populacionoj grupi.

**Cilj** rada je da se utvrde odnosi između vrednosti u krvi homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> sa vrstom i stadijumom maligne bolesti, utvrde efekti primenjene terapije na promene u vrednostima homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> i proceni značaj homocisteina kao mogućeg markera tumorske aktivnosti.

**Pacijenti i metod:** Koncentracije homocisteina u plazmi, vitamina B<sub>12</sub> u serumu i folne kiseline u serumu određivane su pre i nakon primenjene terapije (operativno lečenje, radioterapija i hemioterapija) kod 46 dece sa novodijagnostikovanim malignim oboljenjem (solidni tumori i limfoproliferativna oboljenja). Ispitanici su bili uzrasta od 2 meseca do 18 godina.

**Rezultati:** Koncentracije homocisteina kod dece sa malignim oboljenjem su bile značajno niže nakon sprovedenog lečenja ( $p < 0,01$ ). Koncentracija vitamina B<sub>12</sub> kod dece sa malignim oboljenjem je bila značajno viša nakon sprovedene terapije ( $p < 0,05$ ). Takođe je utvrđeno da su vrednosti koncentracije folne kiseline kod dece sa malignim solidnim tumorima bile značajno više u odnosu na decu sa malignim limfoproliferativnim i plazma ćelijskim oboljenjima ( $p < 0,01$ ). Istraživanje je pokazalo da se u višim stadijumima maligne bolesti očekuju i više koncentracije homocisteina ( $p < 0,05$ ).

**Zaključak:** Homocistein bi mogao biti marker malignih bolesti kod dece. Neophodna su dalja ispitivanja kako bi se utvrdio značaj homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> u malignitetu dečjeg uzrasta.

**Ključne reči:** deca, folna kiselina, homocistein, malignitet, vitamin B<sub>12</sub>

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Hematoonkologija

---

---

---

---

## PROGNOSTIC IMPORTANCE OF HOMOCYSTEINE, FOLIC ACID AND

### VITAMIN B<sub>12</sub> IN CHILDHOOD MALIGNANCY

#### **Abstract**

**Background:** Hyperhomocysteinemia is associated with carcinogenesis. There is little available research on hyperhomocysteinemia and malignancy in children, and is insufficient to draw a definitive conclusion as to the possible importance of homocysteine for this population group.

**The aim** of the present study was to determine the blood levels of homocysteine, folic acid and vitamin B<sub>12</sub> in accordance to type and stage of malignant disease, to establish the effects of the adjacent therapy on homocysteine, folic acid and vitamin B<sub>12</sub> levels as well as to estimate the importance of homocysteine as possible tumor marker.

**Patients and methods:** Forty-six children with newly diagnosed malignant disease (solid tumors and lymphoproliferative disease) were included in the present study. The patients were between two months and 18 years of age.

**Results:** The plasma concentration of homocysteine in children with malignant disease was significantly lower following treatment ( $p < 0.01$ ). The concentration of vitamin B<sub>12</sub> in children with malignant diseases was significantly higher following treatment ( $p < 0.05$ ). The concentration of folic acid in children with malignant solid tumors was demonstrated to be significantly higher than in children with malignant lymphoproliferative and plasma cell diseases ( $p < 0.01$ ). The study demonstrated that the children with higher stages of malignant disease had higher levels of homocysteine ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Homocysteine could be a marker of malignancy in children. Further research is needed to establish the importance of homocysteine, folic acid and vitamin B<sub>12</sub> in pediatric malignant diseases.

**Keywords:** children, folic acid, homocysteine, malignancy, vitamin B<sub>12</sub>

Scientific field: Medicine

Special topics: Hematooncology

---

---

---

---

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Istorijat.....	3
1.2. Biomedicinski značaj homocisteina.....	5
1.2.1. Metabolizam homocisteina.....	5
1.2.2. Unutarćelijski metabolizam homocisteina i veza vitamin B <sub>12</sub> – folna kiselina .....	7
1.2.3. Posledice promena u jedno-karbonskom metabolizmu.....	10
1.2.3.1. Sinteza timidilata i DNK.....	10
1.2.3.2. Poremećaji hromozoma i ćelijskog ciklusa.....	11
1.3. Homocistein u serumu i plazmi.....	12
1.4. Vitamin B <sub>12</sub> u serumu.....	16
1.5. Folna kiselina u serumu.....	19
1.6. Homocistein i folatni antagonisti.....	21
1.6.1. Homocistein kao marker efikasnosti antifolata.....	23
1.7. Hiperhomocisteinemija i bolesti kod dece.....	24
1.8. Hiperhomocisteinemija i karcinogeneza.....	26
1.8.1. Mehanizam hiperhomocisteinemija – karcinogeneza.....	26
1.8.2. Hiperhomocisteinemija i malignitet kod dece.....	32
2. Ciljevi istraživanja.....	36
3. Materijal i metod istraživanja.....	37
4. Rezultati.....	40
4.1. Opšte karakteristike ispitivane grupe.....	40
4.2. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od terapijskog modaliteta.....	56
4.3. Mokraćna kiselina i laktat dehidrogenaza u zavisnosti od terapijskog modaliteta.....	68
4.4. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od embrionalnog porekla maligniteta.....	70
4.5. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od vrste maligniteta.....	73

---

---

---

---

4.6. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od lokalizacije maligniteta.....	75
4.7. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od rasprostranjenosti bolesti.....	78
4.8. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> kod B- i T-ćelijskih maligniteta kod ALL i NHL.....	80
4.9. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od nalaza aspirata kostne srži.....	81
4.10. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od N-myc amplifikacije ćelija neuroblastoma.....	82
4.11. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od prisustva organomegalije.....	84
4.12. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od ishoda bolesti.....	85
5. Diskusija.....	90
5.1. Opšte karakteristike ispitivane grupe.....	90
5.2. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od terapijskog modaliteta – pre i nakon celokupne terapije.....	93
5.3. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od terapijskog modaliteta – pre i nakon operativnog lečenja.....	95
5.4. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od terapijskog modaliteta – pre i nakon hemioterapije.....	97
5.5. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od terapijskog modaliteta – pre započinjanja lečenja i nakon hemioterapije i operativnog lečenja.....	98
5.6. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od terapijskog Modaliteta – pre započinjanja lečenja i nakon hemioterapije, radioterapije ili operativnog lečenja.....	100
5.7. Prihvaćeni markeri i transaminaze i korelacija sa homocisteinom.....	101
5.8. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od embrionalnog porekla maligniteta.....	102

---

---

---

---

5.9. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od vrste maligniteta.....	103
5.10. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od lokalizacije maligniteta.....	105
5.11. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od rasprostranjenosti bolesti.....	106
5.12. Homocistein, folna kiselina i vitamin vitamin B <sub>12</sub> kod B- i T-ćelijskih maligniteta kod ALL i NHL.....	107
5.13. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od nalaza aspirata kostne srži.....	108
5.14. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od N-myc amplifikacije ćelija neuroblastoma.....	109
5.15. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od prisustva organomegalije.....	110
5.16. Homocistein, folna kiselina i vitamin B <sub>12</sub> u zavisnosti od ishoda bolesti.....	111
6. Zaključci.....	113
7. Literatura.....	116
Biografija autora	
Izjava o autorstvu	
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	
Izjava o korišćenju	

---

---



## SKRAĆENICE KORIŠĆENE U RADU

BHMT - betain-homocistein metiltransferaza  
CBS - cistation- $\beta$ -sintaza  
DHFR - dihidrofolat reduktaza  
DNK – deoksiribonukleinska kiselina  
dTMP - deoksitimidin monofosfat  
dTTP - deoksitimidin trifosfat  
dU - deoksiuridin  
dUMP - deoksiuridin monofosfat  
dUTP - deoksiuridin trifosfat  
FK – folna kiselina  
HCY – homocistein  
B12 – vitamin B<sub>12</sub>  
H<sub>2</sub>PteGlu - dihidropteroilglutamat  
H<sub>4</sub>PteGlu - tetrahidropteroilglutamat  
H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub> - poliglutamilski oblik tetrahidropteroilglutamata  
HHS - Hordaland homocisteinska studija  
MMA - metilmalonska kiselina  
MS - metionin sintaza  
MTHFR - metilen-tetrahidrofolat reduktaza  
PteGlu - pteroilmonoglutamat  
RNK – ribonukleinska kiselina  
SAM - S-adenozil metionin  
SAH - S-adenozil homocistein  
tHcy - ukupni homocistein  
THF - tetrahidrofolat  
NB – neuroblastom  
PNET - primitivni neuroektodermalni tumor  
ACC - adrenokortikalni karcinom  
WT - Wilmsov tumor  
RMS - rabdomiosarkom  
HL - Hodgkinov limfom  
NHL - Nehodgkinski limfom  
ALL - akutna limfoblastna leukemija  
AML - akutna mijeloidna leukemija  
CML - hronična mijeloidna leukemija  
MDS - mijelodisplazni sindrom  
LCH – Langerhans cell histiocitoza  
HB - hepatoblastom  
YSCa - Yolk Sac karcinom  
MPNST - maligni Schwanom  
AFP – alfa-fetoprotein  
VMA – vanilmandelična kiselina  
HVA – homovanilna kiselina  
Beta HCG – beta humani horionski gonadotropin  
MK – mokraćna kiselina  
LDH – laktat dehidrogenaza  
CS – klinički stadijum

---

---

## 1.UVOD

Homocistein je aminokiselina koja sadrži sumpor i učestvuje u metabolizmu metionina. To je esencijalna aminokiselina koja se metaboliše na jedan od dva načina: remetilacijom i transsulfuracijom. Abnormalnosti ovih puteva dovode do nastanka hiperhomocisteinemije. Ukoliko se nagomilani homocistein ne konvertuje odmah u metionin i cistein, ekskretuje se, strogo regulisanim ćelijskim mehanizmima, u krv. Višak homocisteina se iz krvi uklanja putem jetre i bubrega. Značaj povišene vrednosti homocisteina u krvi je u kliničkoj praksi još uvek predmet diskusije. Hiperhomocisteinemija je prisutna kod oko 5% opšte populacije i udružena je sa povećanim rizikom za nastanak mnogih bolesti kao što su vaskularni i neurodegenerativni poremećaji, autoimune bolesti, kongenitalne anomalije, dijabetes, bolesti bubrega, osteoporoza, neuropsihijatrijski poremećaji i maligne bolesti. Centralno pitanje je da li je klinički opravdano meriti i lečiti povišene vrednosti homocisteina (1,2). Dok određeni autori smatraju da je homocistein samo marker određenih bolesti ali ne i uzročnik koga treba lečiti, ili ignorišu homocistein pripisujući mu ulogu metabolita koji se pojavljuje uz druge faktore rizika, većina naučnih dokaza upućuje na suprotno.

Karcinogeneza je dugotrajni proces postepene akumulacije genetskih abnormalnosti; klonalne populacije ćelija doživljavaju progresivne genetske alteracije koje dovode do pojave maligniteta i selektivnog napredovanja u rastu. Poznato je da je karcinogeneza udružena sa metaboličkim alteracijama koje ubrzavaju neoplastičku progresiju ili nastaju iz nje (3). Samim tim, proučavanjem metaboličkih poremećaja dobijaju se značajni podaci o biološkim karakteristikama tumora i odnosu tumor-pacijent. Ovo je takođe put do pronalaženja novih terapijskih meta.

Metaboličke reakcije u kojima učestvuje folna kiselina nazivaju se jedno-karbonske metaboličke reakcije (4). Promene u jedno-karbonskom metabolizmu se odražavaju na DNK sintezu, popravku i metilaciju, što može dovesti do karcinogeneze (5). Folna kiselina učestvuje u sintezi serina i purinskih i

---

---

pirimidinskih baza i donor je metil grupe u ciklusu sinteze metionina. Homocistein je intermedijarni metabolit u metabolizmu metionina i metaboliše se u metionin i cistein. Tokom ovih metaboličkih ciklusa nastaje i S-adenozil metionin, glavni donor metil grupe u ljudskom organizmu. Koncentracija homocisteina u serumu je osetljivi indikator folatnog statusa organizma; nedostatak folata često je udružen sa hiperhomocisteinemijom, a unosom folata može se sniziti nivo homocisteina (6). Deficit folata dovodi do smanjenja inkorporacije uracila u DNK, što dovodi do nestabilnosti DNK.

Utvrđeno je da su povišene vrednosti homocisteina kod odraslih udružene sa kolorektalnim kancerom (7) i kancerom cerviksa uterusa (8). Alteracije u metioninskom ciklusu su prisutne i kod karcinoma dojke (9), pankreasa (10) i larinksa (11). Umereni deficit folata ne mora biti mutagen *in vivo*. Međutim, zapaženo je da interakcija sa drugim faktorima rizika, genetskim ili iz okruženja, dovodi do tumorske progresije (12).

Povišene vrednosti homocisteina su udružene sa oštećenjem hromozoma čak i u odsustvu deficita folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> i ovaj mehanizam se ne može objasniti poremećajem metabolizma metilacije uracila u timin. Dokazano je da homocistein može direktno oštetiti DNK u prisustvu brojnih reaktivnih oksidanata (13), a takođe je prisutno mišljenje da povišen nivo homocisteina u plazmi dovodi do karcinogeneze putem oksidativnog oštećenja DNK posredovanog metalima (13). Intracelularni deficit vitamina B<sub>12</sub> je udružen sa hromozomskim oštećenjem ćelija oralne mukoze kod pušača (14). Takođe, poznato je da konzumiranje alkohola i pušenje cigareta menja nivo homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> (15).

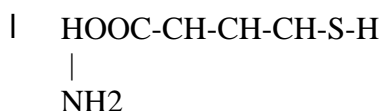
Prema našim dosadašnjim saznanjima, istraživanja vezana za koncentraciju homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> kod dece obbolele od malignih bolesti su rađena samo kod dece obbolele od akutne limfoblastne leukemije (16-18). Ovim istraživanjem pokušaćemo da razjasnimo ulogu koju oni imaju u patogenezi ne samo akutne limfoblastne leukemije, već i drugih malignih bolesti kod dece.

---

---

## 1.1. Istorijat

Prvi autor koji je opisao homocistein 1932. godine bio je američki biohemičar Vincent Du Vigneaud koji je kasnije, 1955. godine, dobio Nobelovu nagradu iz oblasti hemije (19). Novu aminokiselinu je otkrio uklanjajući metil grupu sa metionina. S obzirom da ova aminokiselina ima iste funkcionalne grupe kao aminokiselina cistein, tj. sulfhidrilne, amino i karboksilne grupe uz jedan dodatni ugljenikov atom, dao joj je ime homocistein (slika 1).



Slika 1. Molekul homocisteina

Četvorouglnična osnova homocisteina omogućuje formiranje unutrašnjeg cikličnog anhidrida koji je nazvan homocistein tiolakton. Ova komponenta sa petočlanim prstenom daje stabilnu so sa jakim kiselinama, ali ukoliko se neutrališe sa slabim bazama, prsten se otvara, formiraju se dva peptidna lanca između dva molekula tiolaktona i nastaje homocistein diketopiperazin. Homocistein se dobija hidrolizom homocistein tiolaktona sa jakim bazama; on se konvertuje u metionin prenošenjem metil grupa sa komponenti kao što su holin i betain, procesom koji se naziva transmetilacija. Du Vigneaud je takođe otkrio da se homocistein konvertuje u cistein, metaboličkom reakcijom u kojoj je cistation intermedijarni metabolit.

Mueller je prethodno, 1922. godine, otkrio aminokiselinu metionin, a studije na životinjama 1930.-ih godina pokazale su da je ova aminokiselina esencijalna za rast. S obzirom da se metionin metabolički može konvertovati u homocistein, cistation i cistein, kako je to Du Vigneaud otkrio, aminokiselina cistein nije esencijalna za rast ukoliko se metionin unosi hranom.

Tokom 1940.-ih i 1950.-ih nije se mnogo saznalo o homocisteinu. Ništa se nije znalo o njegovom kliničkom značaju, tako da je jedinjenje imalo skromni status

---

---

matabolički intermedijarne aminokiseline koja sadrži sumpor. Iako su članovi Du Vigneaudove biohemijske laboratorije identifikovali nekoliko dece sa homocisteinom u urinu (o ovim slučajevima se diskutovalo na konferenciji u bolnici u Njujorku 1950.-ih), nalazi nikad nisu objavljeni.

Grupa naučnika iz Belfasta je 1962. godine sproveda skrining urina na aminokiseline kod mentalno retardirane dece, koristeći nove tehnike hromatografije. Kod nekolicine je pronađen homocistein u urinu, a bolest je nazvana homocistinurija. Ova deca su imala, osim mentalne retardacije, i druge abnormalnosti kao što su ubrzan rast, dislokaciju očnog sočiva, osteoporozi i druge pridružene koštane abnormalnosti, kao i tendenciju ka razvoju arterijskih i venskih tromboza. Skoro istovremeno, slučajevi homocistinurije su otkriveni u Wiskonsinu i Wills Eye bolnici u Filadelfiji. Mudd i saradnici na Nacionalnom zdravstvenom institutu (National Institutes of Health) kod većine obolelih su otkrili deficit cistation sintaze, vitamin B<sub>6</sub> zavisnog enzima. U Filadelfiji su Spaeth i saradnici otkrili da je terapija vitaminom B<sub>6</sub> efikasna kod većine obolelih od homocistinurije. Kasnije je otkriveno da je homocistinurija udružena sa prevremenom okluzivnom kardiovaskularnom bolešću, koja se javlja već u detinjstvu, tako da 25% ovih pacijenata umire od kardiovaskularnih komplikacija pre 30-te godine života.

McCully je 1969. godine opisao vaskularnu patologiju kod ovih pacijenata: proliferaciju glatkih mišića, progresivnu sklerozu arterija i promene u hemostazi.

Tokom poslednjih godina interes za homocistein je naglo porastao, tako da je homocistein dobio status najinteresantnijeg agensa u oblasti vaskularne medicine. Osim kod arterioskleroze i bolesti srca, interesovanje za ovu aminokiselinu je naglo poraslo i na polju biologije, fiziologije, u rasponu od uticaja na endotel do starenja, oksidativnog metabolizma, oksidativnog stresa, embriologije, reproduktivne fiziologije, endokrinologije, neuralne transmisije i neurodegenerativnih bolesti, maligniteta, rasta ćelija i ćelijske deobe.

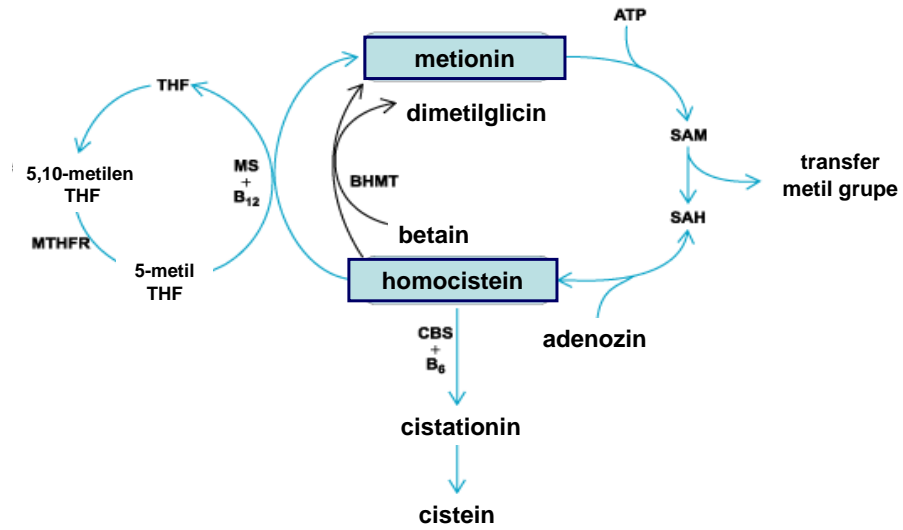
---

---

## 1.2. Biomedicinski značaj homocisteina

### 1.2.1. Metabolizam homocisteina

Homocistein je aminokiselina koja sadrži sumpor i nastaje iz metionina (Slika 2). Metionin iz hrane se konvertuje do metil donora S-adenozil metionina (SAM) i demetiliše do S-adenozil homocisteina (SAH) i homocisteina. Homocistein se ponovo konvertuje u metionin jednim od dva remetilaciona puta ili se transulfuriše do cisteina (20). Tokom folatnog ciklusa remetilacije, koju katalizuje enzim metionin sintaza (MS), homocistein dobija metil grupu iz 5-metil-tetrahydrofolata (5-methylTHF), pri čemu je, u ovoj reakciji, kofaktor vitamin B<sub>12</sub> (kobalamin). U pomoćnom putu, u reakciji koju katalizuje betain-homocistein metiltransferaza (BHMT), donor metil grupe je betain. U reakciji transulfuracije, homocistein se kondenzuje sa serinom i nastaje cistation, u reakciji koju katalizuje cistation-β-sintaza (CBS), a koji se dalje hidrolizuje uz pomoć enzima γ-cistionaze u cistein i α-ketobutirat. Vitamin B<sub>6</sub> (piridoksil fosfat) je kofaktor u obe ove reakcije. Cistein učestvuje u brojnim ćelijskim reakcijama, u koje spadaju i sinteza proteina i glutaciona. Homocistein se u jetri i bubrezima takođe remetiliše u reakciji koju katalizuje enzim BHMT, koji prenosi metil grupu do homocisteina putem demetilacije betaina do dimetilglicina.



Slika 2. Metabolički putevi homocisteina.

---

---

### 1.2.2. Unutarćelijski metabolizam homocisteina i veza vitamin B<sub>12</sub> – folna kiselina

Pteroilpoliglutamati su prirodni supstrati brojnih enzima uključenih u jedno-karbonski metabolizam. Pteroilmonoglutamati mogu biti poliglutamirani u prisustvu folilpoliglutamat sintaze pre nego što se uključe u jedno-karbonski metabolizam. Tetrahidropteroilglutamat (H<sub>4</sub>PteGlu) je najčešći fiziološki supstrat folilpoliglutamat sintaze, a poliglutamilski oblik (H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub>) ima centralnu ulogu u jedno-karbonskom metabolizmu (21). Faktori koji ograničavaju snabdevanje H<sub>4</sub>PteGlu ili regulišu folilpoliglutamat sintazu, utiču na poliglutamaciju i zadržavanje folata u ćeliji. H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub> se može transformisati u 10-formil- H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub> (neophodan za *de novo* biosintezu purina) i u formaldehid 5,10-metilen- H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub> (neophodan u sintezi timidilata). Ova dva jedinjenja, 5,10-metilen- H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub> i 10-formil- H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub> mogu se, preko intermedijarnih jedinjenja, konvertovati jedan u drugi.

Da bi se razumela funkcija folata kao koenzima, bitno je znati da je 5,10-metilen-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub> prisutan u timidilatnom ciklusu u sintezi timidina i DNK sintezi uz pomoć enzima timidilat sintaze, kao i u metilacionom ciklusu, u kome, nakon konverzije u 5-metil-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub>, uz pomoć metionin sintaze, nastaju metionin i H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub>.

Pteroilmonoglutamat (PteGlu, folna kiselina) nije biološki aktivan oblik folata. Ukoliko se terapijski primeni, potrebno je da se redukuje do H<sub>4</sub>PteGlu uz pomoć dihidrofolat reduktaze u dvostepenoj reakciji (pteroilglutamat (PteGlu) → dihidropteroilglutamat (H<sub>2</sub>PteGlu) → tetrahidropteroilglutamat (H<sub>4</sub>PteGlu)). Glavni oblik folata transportovanog u ćeliju preko folatnog receptora i redukovanog folatnog nosača je 5-metil-H<sub>4</sub>PteGlu. Folatima posredovani jedno-karbonski mehanizam je najverovatnije smešten između intraćelijskih organela, čime je omogućeno da se supstrat vezuje duž folatnih koenzima. Npr. neki od enzima distalno od H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub> su multifunkcionalni, dopuštajući sekvencijalno vezivanje određenih folatnih koenzima (npr. H<sub>4</sub>PteGlu → 5-formino-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub> → 5,10-metilen-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub>). Timidilat sintaza katalizuje prenos formaldehida od 5,10-metilen-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub> na poziciju 5 deoksiuridilata; u ovoj reakciji 5,10-metilen-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub> se takođe redukuje u dihidrofolat, koji inhibira 5,10-metilen-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub>



---

---

reduktazu. S obzirom da metionin, proizvod reakcije koju katalizuje metionin sintaza, takođe inhibira ovaj enzim, jasno je kako promene u 5,10-metilen- $H_4PteGlu_n$  reduktazi zbog koncentracije dihidrofolata i metionina, mogu uticati na stepen uključivanja 5,10-metilen- $H_4PteGlu$  u metilacioni i timidilatni ciklus.

Metabolizam folata i folat-zavisnih enzima se odvija u mitohondrijalnom matriksu i citoplazmi (svaki od ovih odeljaka sadrži skoro podjednake koncentracije folatnih kofaktora) i oni su homolozi brojnih enzima u citozolu mitohondrija (4). Monoglutamati folata se transportuju iz citoplazme u mitohondrije preko redukovanog folatnog nosača koji je specifičan za mitohondrije (22). U mitohondrijama se monoglutamati konvertuju u poliglutamatske oblike. Većina jedno-karbonskih jedinica, u obliku formata, nastaje u mitohondrijama i koriste se za sintezu formata, glicina i f-met-tRNK. Istraživanja novijeg datuma upućuju na postojanje blagog jednosmernog protoka jedno-karbonskih jedinica od mitohondrija ka citozolu. U mitohondrijama, 5,10-metilen- $H_4PteGlu$  najpre nastaje konverzijom serina u glicin (uz učešće metabolita katabolizma glicina i holina), nakon čega se odigrava sekvencijalni prenos jedno-karbonskih jedinica do 10-formil- $H_4PteGlu$  i potom do formata, koji zatim napuštaju mitohondrije. Formati se u citozolu spajaju sa  $H_4PteGlu$  i formiraju 10-formil- $H_4PteGlu$ , koji predstavlja najznačajniji izvor folata u citozolu i osnovni izvor jedno-karbonskih jedinica za sintezu timidilata, metionina i purina.

Poznato je da deficit vitamina  $B_{12}$  dovodi do funkcionalnog unutarćelijskog deficita 5,10-metilen- $H_4PteGlu_n$ . Hipoteza o metil-folatnoj klopci ("Methyl-folate trap hypothesis") prvobitno je formulisana sa ciljem da objasni zašto deficit vitamina  $B_{12}$  dovodi do funkcionalnog deficita folata (23). U fiziološkim uslovima, 5-metil- $H_4PteGlu$  se konvertuje u  $H_4PteGlu$  u prisustvu vitamin  $B_{12}$ -zavisne metionin sintaze, a potom se postepeno poliglutamatiše i nakon toga uključuje u jedno-karbonski metabolizam. Metionin sintaza se inaktiviše ukoliko postoji deficit vitamina  $B_{12}$ , što dovodi do nagomilavanja 5-metil- $H_4PteGlu$ , koji je nedovoljan supstrat za folilpoliglutamatsku sintazu. S obzirom da ne postoji alternativni metabolički put, osim ove vitamin  $B_{12}$ -zavisne reakcije, „zarobljeni“ ("trapped") 5-metil- $H_4PteGlu$  napušta ćeliju i dolazi do progresivnog deficita unutarćelijskih poliglutamatskih folata. Hipoteza o formatnom gladovanju ("The formate starvation hypothesis") bazira se

---

---

na relativno većem značaju formata (u obliku 10-formil- $H_4PteGlu_n$ ) i prekuzora formata, metionina, čija je koncentracija takođe smanjena u uslovima kada je metionin sintaza inhibirana zbog deficita vitamina  $B_{12}$  (24). Kada je unutarćelijska koncentracija metionina u višku, njegova metil grupa se oksidiše do formata, koji su supstrat za nastanak 5-formil i 10-formil- $H_4PteGlu_n$ . Istraživanja potvrđuju obe hipoteze.

---

---

### 1.2.3. Posledice promena u jedno-karbonskom metabolizmu

#### 1.2.3.1. Sinteza timidilata i DNK

Deficit vitamina B<sub>12</sub> ili folne kiseline dovodi do smanjenja 5,10-metilen-H<sub>4</sub>PteGlu i prekida reakciju posredovanu timidilat sintazom, kojom se deoksiuridin monofosfat (dUMP) konvertuje u deoksitimidin monofosfat (dTMP) (21). Iako postoje alternativni putevi u kojima učestvuje timidin kinaza, a čiji je udeo 5% do 10% sinteze timidina, ovim putevima se ne može obezbediti preostalih 90% potreba za proizvodnjom dTMP (dodatni putevi u sintezi purina se mogu aktivirati u slučaju potrebe za povećanjem količine purina preko reakcija u kojima učestvuju folatni koenzimi). Deficit timidina dovodi do značajnog povećanja odnosa dUMP/dTMP. Zbog smanjenja dTMP (i eventualno deoksitimidin trifosfata (dTTP)), dolazi do povećanja dUMP i deoksiuridin trifosfata (dUTP). S obzirom da DNK polimeraza ne razlikuje dUTP i dTTP, povišeni nivo dUTP potpomaže pogrešnu inkorporaciju rezidua uridina u DNK. Ključni enzim, DNK uracil glikozilaza, prepoznaje ovu pogrešnu inkorporaciju. Ona iseca dUTP, ali neadekvatno snabdevanje dTTP dalje dovodi do izostanka popravke prekida u ovom DNK lancu. Ponavljani prekidi DNK lanca dovode do značajne fragmentacije DNK lanca, pri čemu fragmenti DNK napuštaju ćeliju. Opisani mehanizam predstavlja osnovu testa deoksiuridin (dU) supresije koji se primenjuje u kliničkim istraživanjima da bi se razlikovao deficit vitamina B<sub>12</sub> od deficita folne kiseline ili kada se sumnja na urođene deficite metabolizma B<sub>12</sub> i folne kiseline.

---

---

### 1.2.3.2. Poremećaji hromozoma i ćelijskog ciklusa

Poremećaj sinteze DNK prate brojne abnormalnosti hromozoma kao što je izrazita elongacija hromozoma praćena despiralizacijom udruženom sa nasumičnim prekidima i preteranim skraćanjem centromera, ekspresijom folat-senzitivnih fragilnih mesta u hematopoetskim ćelijama i redukovanom biosintezom, acetilacijom i metilacijom histona bogatih argininom. Sve ovo dovodi do narušavanja reda u ćelijskom ciklusu, tako da se povećava broj ćelija u profazi mitoze i G<sub>2</sub> fazi. U *in vitro* modelima eritroblastoze usled nedostatka folata, apoptoza eritroblasta u kasnim stadijumima diferencijacije jasno dovodi do smanjene proizvodnje eritrocita i anemije (21).

---

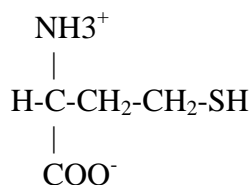
---

### 1.3. Homocistein u serumu i plazmi

Ukoliko se javi poremećaj u metabolizmu homocisteina i njegovog nagomilavanja, dolazi do povećanja njegove koncentracije u plazmi i urinu. Mehanizam kojim se homocistein transportuje iz ćelija još uvek nije dovoljno proučen (20,25). Ovaj transportni mehanizam se nadovezuje na katabolizam homocisteina i proces transulfuracije. Ova dva mehanizma regulišu unutarćelijsku koncentraciju homocisteina i održavaju je niskom zbog potencijalne citotoksičnosti homocisteina. Ukoliko postoji poremećaj bubrežne funkcije, transportnim mehanizmom će se višak homocisteina sekretovati u cirkulaciju. Ovim transportnim mehanizmom se ograničava intraćelijska toksičnost, ali se povećava verovatnoća ekstraćelijskog toksičnog dejstva homocisteina.

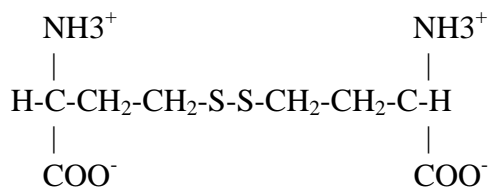
Više od 70% homocisteina je u plazmi vezano za albumin. Od ostataka homocisteina nastaju dimeri homocisteina ili se homocistein kombinuje sa drugim tiolima formirajući disulfide, a može da cirkuliše i kao slobodno tiolsko jedinjenje. Ukupni homocistein (tHcy) predstavlja koncentraciju sva četiri oblika homocisteina u plazmi i preporuka je da se on određuje u kliničkoj praksi (26)(Slika 3).

Redukovani oblik homocisteina (Hcy-SH) < 1%



Oksidirani oblici homocisteina (Hcy-S-S-R)

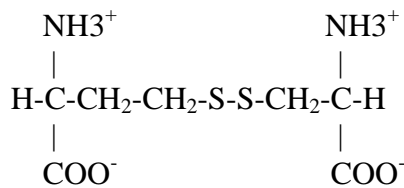
Dimer homocisteina Hcy-S-S-Hcy 5 – 10%



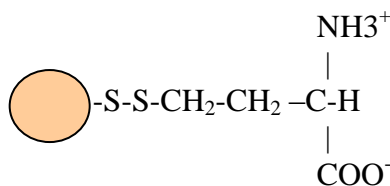
---

---

Homocisteinilcistein (mešoviti disulfid) Hcy-S-S-Hcy 5 – 10%



Protein-Cys-S-S-Hcy 70 – 80%



Slika 3. Obilici homocisteina u plazmi.

Deficit vitamina B<sub>12</sub> i folne kiseline u ishrani dovodi do snižavanja njihovih koncentracija unutar ćelija. Ukoliko postoji unutarćelijski deficit enzima kojima su vitamin B<sub>12</sub> i folna kiselina kofaktori, dolazi do neadekvatnog korišćenja vitamina B<sub>12</sub> i folne kiseline, a da je pritom unutarćelijski nivo ovih koenzima normalan. Deficit koenzima i enzima podjednako će uticati na glavne reakcije koje katalizuju vitamin B<sub>12</sub> ili folat-zavisni enzimi. Snižena je aktivnost metionin sintaze, što dovodi do nagomilavanja njenog supstrata homocisteina i do povećanja koncentracije homocisteina u serumu.

Koncentracija ukupnog homocisteina (tHcy) predstavlja zbir svih oblika homocisteina u plazmi i serumu; uključuje slobodne oblike i homocistein vezan za proteine, i može se određivati u plazmi ili serumu (27,28). Koncentracije homocisteina u plazmi su nešto niže nego u serumu.

Zahvaljujući brznoj degradaciji, koncentracije homocisteina u cirkulaciji su niske kod zdravih osoba. Normalna koncentracija homocisteina u serumu se kreće u rasponu od 5,1 do 13,9 μmol/L. Kod odraslih mlađih žena, prosečna koncentracija homocisteina je 6 – 8 μmol/L, dok je kod mlađih muškaraca nešto veća i iznosi oko

---

---

10  $\mu\text{mol/l}$  (29-31). Nakon 40. godine života, koncentracija homocisteina u plazmi se povećava za oko 0,5 – 1  $\mu\text{mol/L}$  za svaku deceniju kod oba pola (32,33). Kod dece uzrasta 1 – 15 godina, srednja vrednost koncentracije homocisteina je niska i iznosi 4 – 7  $\mu\text{mol/L}$  (18,34-37). Koncentracija ukupnog homocisteina se povećava tokom godina (35,38). Pojedina istraživanja pokazuju da dečaci, tokom i posle puberteta, imaju nešto veće koncentracije homocisteina u plazmi od devojčica (39,40), ali veliki broj studija to ne potvrđuje (37,41-45). U srednjem adolescentnom uzrastu (15 – 18 godina) normalne vrednosti homocisteina se kreću u rasponu 4,6 – 13,9  $\mu\text{mol/L}$ . Kod novorođenčadi i odojčadi, srednja vrednost koncentracije ukupnog homocisteina iznosi 6 – 9  $\mu\text{mol/L}$ , što predstavlja nešto višu vrednost od one izmerene kod starije dece (46-49).

Što je koncentracija homocisteina veća, to su klinički poremećaji izraženiji. Rezultati Hordaland homocisteinske studije (HHS), kojom je obihvaćeno 18 000 žena i muškaraca uzrasta 40 – 67 godina, pokazuju da je koncentracija ukupnog homocisteina u plazmi povezana sa brojnim fiziološkim faktorima, navikama i određenim bolestima. Godine, muški pol, pušenje, konzumiranje kafe, visok arterijski krvni pritisak, nepovoljan lipidni profil, gojaznost, visok kreatinin i 5,10-metilen-tetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) 677 C→T polimorfizam su najčešći faktori udruženi sa povećanom koncentracijom ukupnog homocisteina; fizička aktivnost, umerena konzumacija alkohola, dobar folatni i vitamin B<sub>12</sub> status su udruženi sa nižim koncentracijama. Značajna udruženost između koncentracije ukupnog homocisteina u plazmi i kliničkih posledica zapažena je pri koncentraciji homocisteina preko 15  $\mu\text{mol/L}$ , ali za većinu stanja, postoji kontinuirana veza koncentracija – odgovor bez jasnog koncentracionog praga (50). Koncentracija tHcy >15  $\mu\text{mol/L}$  prihvaćena je kao nezavisni faktor rizika za kardiovaskularna oboljenja.

Faktori koju utiču na koncentraciju homocisteina u plazmi kod dece, slični su onima kod odraslih, a to su: uzrast, pol, ishrana, B-vitaminski status i lekovi koji interferiraju sa funkcijom ovih vitamina (51). Povišene koncentracije homocisteina kod dece javljaju se kod bubrežne insuficijencije (52) i kod šloga (53). Uloga homocisteina u proceni kardiovaskularnog rizika kod dece još nije razjašnjena.

U originalnoj Framingenskoj kohortnoj studiji (Framingham Heart Study), od 1160 starijih ispitanika, trećina je imala visoke vrednosti homocisteina u plazmi,

---

---

koji je inverzno korelirao sa koncentracijom folne kiseline u plazmi i nešto manje sa koncentracijom vitamina B<sub>12</sub> i vitamina B<sub>6</sub>. Povišena koncentracija homocisteina u plazmi kod starijih ispitanika, kod većine je objašnjena lošim vitaminskim statusom.

Ukoliko se uzorak pune krvi ostavi na sobnoj temperaturi duže od 4 sata, koncentracija homocisteina se povećava tokom naredna 24 sata. Zamrznuti serum se, međutim, može koristiti za precizno određivanje koncentracije homocisteina tehnikom senzitivnog eseja.

Povišena vrednost koncentracije homocisteina, hiperhomocisteinemija, se deli na blagu (16 – 24 μmol/L), umerenu (25 - 100 μmol/L) i izraženu (>100 μmol/L) (54).



---

---

## 1.4. Vitamin B<sub>12</sub> u serumu

Vitamin B<sub>12</sub> je zajednički naziv za biološki aktivne kobalamine u ljudskom metabolizmu. Osnovu hemijske strukture čini jedinjenje slično porfirinu, koje se sastoji od četiri pirolska prstena i atomom kobalta u centralnom delu. Biohemijski markeri za vitamin B<sub>12</sub> status su koncentracija kobalamina u serumu ili plazmi, koncentracija holo-transkobalamina i koncentracija metilmalonske kiseline (MMA). Određivanje kobalamina u serumu i plazmi je jednostavno i praktično u istraživanjima sa velikim brojem ispitanika ali ima ograničenu senzitivnost i specifičnost u dijagnostičkoj primeni (55). Holo-transkobalamin je frakcija vitamina B<sub>12</sub> koja je dostupna za ulazak u ćelije i smatra se ranim markerom promena vitamin B<sub>12</sub> statusa. Koncentracija MMA je vrlo specifičan marker za deficit vitamina B<sub>12</sub>, ali je njegovo određivanje veoma skupo. Naime, koncentracija vitamina B<sub>12</sub> u serumu odražava varijacije dva transportna kobalaminska proteina: holo-transkobalamina (ranije nazvan transkobalamin II) i haptokorina (ranije nazvan transkobalamin I). Vitamin B<sub>12</sub> vezan za holo-transkobalamin čini manje od 20% cirkulišućeg vitamina B<sub>12</sub>, koji ulazi u tkiva preko specifičnih receptora. Vitamin B<sub>12</sub> vezan za haptokorin čini 80% cirkulišućeg vitamina B<sub>12</sub> i on je metabolički neaktivan. Određivanje koncentracije vitamina B<sub>12</sub> u serumu obično se koristi radi utvrđivanja deficita ovog vitamina. U većini slučajeva, koncentracija vitamina B<sub>12</sub> nije pouzdan biohemijski indikator pravog deficita vitamina B<sub>12</sub> (55,56). Niske koncentracije vitamina B<sub>12</sub> u serumu nisu sinonim za deficit vitamina B<sub>12</sub>; neke udružene bolesti i stanja mogu lažno povišiti ili sniziti koncentraciju vitamina B<sub>12</sub> („lažno pozitivne i lažno negativne“ koncentracije) (tabela 1). Istraživanja ukazuju da postoji izvestan broj pacijenata sa pravim deficitom vitamina B<sub>12</sub> i normalnom koncentracijom vitamina B<sub>12</sub> u serumu (57-60). Kod dece, raspon normalnih koncentracija vitamina B<sub>12</sub> u serumu je veoma širok, zavisno od uzrasta i pola, i kreće se od 134 do 1117 pmol/L (Tabela 2). Normalna koncentracija vitamina B<sub>12</sub> kod odraslih se kreće u rasponu od 200 do 500 pmol/L. Tradicionalno prihvaćena normalna minimalana koncentracija od 200 pmol/L je predmet diskusije, zato što je moguće detektovati subklinički deficit vitamina B<sub>12</sub> i pri većoj koncentraciji, metodom eseja metilmalonske kiseline i homocisteina.

---

---

Tabela 1. Vitamin B<sub>12</sub> u serumu: lažno pozitivni i lažno negativni rezultati.

---

Lažno niska koncentracija vitamina B<sub>12</sub> u serumu

---

Deficit folne kiseline (trećina pacijenata)

Trudnoća

Primena oralnih kontraceptiva

Multipli mijelom

Transkobalamin I (haptokorin) deficit

Serum pacijenta sadrži druge radioizotope (<sup>99m</sup>Tc ili <sup>67</sup>Ga i druge radiofarmake koji se koriste za skeniranje organa)

HIV

---

Lažno visoke ili normalne koncentracije vitamina B<sub>12</sub> u serumu

---

Visok haptokorin: mijeloproliferativne bolesti, bolesti bubrega

Nizak ili odsutan transkobalamin

Polimorfizam transkobalamina (nizak afinitet)

Nasledni poremećaji metabolizma vitamina B<sub>12</sub>

Aktivacija makrofaga koji stvaraju TC II (npr. autoimune bolesti, monoblastne leukemije i limfomi)

Oslobađanje vitamina B<sub>12</sub> iz tkiva: bolesti jetre

Prisustvo analoga vitamina B<sub>12</sub>: NO, visoke doze vitamina C, bujanje crevnih bakterija

Nedavna terapijska primena vitamina B<sub>12</sub>

---

Tabela 2. Koncentracije vitamina B<sub>12</sub> i folne kiseline u serumu kod dece.

Uzrast	dečaci	devojčice
Vitamin B <sub>12</sub>	pmol/L	pmol/L
0-1 godina	216-891	168-1117
2-3 godine	195-897	307-892
4-6 godina	181-795	231-1038
7-9 godina	200-863	182-866
10-12 godina	135-803	145-752
13-18 godina	158-638	134-605
Folna kiselina	nmol/L	nmol/l
0-1 godina	16,3-50,8	14,3-51,5
2-3 godine	5,7-34,0	3,9-35,6
4-6 godina	1,1-29,4	6,1-31,9
7-9 godina	5,2-27,0	5,4-30,4
10-12 godina	3,4-24,5	2,3-23,1
13-18 godina	2,7-19,9	2,7-16,3

Podaci su sakupljeni od hospitalizovanih pacijenata; vrednosti 2,5-97,5 percentila su adaptirane Hoffmanovom tehnikom. Uzorci >100 pacijenata u svakoj uzrastnoj grupi su analizirani tehnikom radioimunoeseja.

Podaci preuzeti iz: Yee LD, Bollard M, Geaghan MS. Normal blood values: selected reference values for neonatal, pediatric, and adult populations. In: Hoffman R, Benz JE Jr, Shattil JS, Furie B, Silberstein EL, McGlave P, Heslop H, editors. Hematology: Basic Principles and Practice, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia:Churchill Livingstone Elsevier; 2009. p. 2435. (61)

Oprez: koncentracija folne kiseline u serumu može biti snižena uprkos postojanju normalnih vrednosti folata u eritrocitima ukoliko postoji sistemsko oboljenje i kod kratkotrajno sniženog unosa folata.

---

---

## 1.5. Folna kiselina u serumu

Termin folati se odnosi na biološki aktivne metabolite. Hemijska struktura nutritivnih folata predstavljena je pteridinskim prstenom pričvršćenim za *p*-aminobenzoat i poliglutamilski lanac. Samim tim, dužina može varirati od jedne monoglutamilske polovine do multiplih. Sintetska folna kiselina se isključivo javlja u obliku vezanom za monoglutamilsku polovinu umesto za poliglutamilski lanac. Zahvaljujući velikoj stabilnosti i kvantitativnoj apsorpciji (> 90%), folna kiselina se koristi za obogaćivanje („fortifikacija“) hrane i vitaminskih suplemenata. Folati i folna kiselina se koriste za nastanak derivata kao što je tetrahidrofolat (THF) koji se vezuje za jedno-karbonske jedinice sa različitim oksidativnim stanjem: 10-formil-THF, 5-formil-THF, 5,10-metenil-THF, 5-formimino-THF, 5,10-metilen-THF i 5-metil-THF. Poslednji navedeni derivat je najvažniji folat u ljudskom metabolizmu i oblik koji se transportuje u plazmi. Biohemijski markeri folatnog statusa u ljudskom metabolizmu su koncentracije folata u serumu i u eritrocitima. Serumske koncentracije se brzo menjaju nakon unosa folata ili folne kiseline. Nasuprot njima, koncentracije folata u eritrocitima se menjaju sporije, jer je u njima folat inkorporiran i akumuliran tokom eritropoeze. S obzirom da je životni vek eritrocita oko 120 dana, koncentracija folata u eritrocitima se koristi kao indikator folatnog statusa dužeg trajanja.

Normalne koncentracije se kreću od 5 do 30 ng/L, ali mogu biti i dosta veće ukoliko se unosi hrana bogata folatima. Minimalna koncentracija od najmanje 4 ng/L je neophodna za sintezu DNK. Međutim, u dečjem uzrastu, normalne koncentracije se kreću od 1,1 do 51,5 ng/L i zavise od uzrasta i pola (tabela 2). Po pravilu, zalihe folata u jetri, putem enterohepatičnog ciklusa, održavaju koncentraciju folne kiseline u serumu u uslovima slabijeg unosa folata ishranom. Međutim, zalihe su ograničene i iscrpljuju se nakon samo nekoliko nedelja neunošenja folata ili ingestije alkohola. Koncentracija folata u serumu se brzo normalizuje ukoliko se isključi alkohol, obnovi ishrana ili se primene suplementi folata. U ovakvoj situaciji, određivanjem koncentracije folne kiseline u eritrocitima se preciznije može detektovati deficit folata jer koncentracija folne kiseline u eritrocitima odražava folatni status u vreme kada su ćelije proizvedene. Međutim,

---

---

unutarćelijska koncentracija folata se deponuje u obliku folat poliglutamata, koji se pre određivanja tehnikom imunoeseja mora hidrolizovati do monoglutamata. Ove pripreme postupke je teško standardizovati, što merenje čini manje pouzdanim. Uz to, koncentracija folne kiseline u eritrocitima će biti abnormalna samo ukoliko deficit folata traje duže vreme i ukoliko pacijent nije primao transfuziju. Lažno nizak nivo folne kiseline se viđa kod 50-60% pacijenata sa primarnim deficitom vitamina B<sub>12</sub> (62).

---

---

## 1.6. Homocistein i folatni antagonisti

Antagonisti folata su počeli da se primenjuju u kliničkoj praksi 1948. godine i ostali su glavni stožer terapije brojnih malignih bolesti kod dece i odraslih. Najčešće primenjivana aktivna komponenta hemoterapijskih protokola je metotreksat (ameterin, 4-amino, 10-metilpteroilglutamska kiselina (63)), iako su do danas proizvedeni brojni novi antagonisti folata, specifičniji za delovanje na različitim nivoima u metabolizmu folata. Mehanizam njihovog delovanja i razvoj rezistencije dobro su poznati i proučeni (64). U današnje vreme, u pedijatrijskoj onkologiji se preporučuju visoke doze metotreksata (do 10 g/m<sup>2</sup>) u terapiji akutne limfoblastne leukemije, nehodgkinskih limfoma i osteosarkoma (63,65). Niže doze metotreksata se takođe dosta koriste u kliničkoj praksi, uglavnom kod neonkoloških hroničnih bolesti, kod kojih imuni procesi imaju glavnu ulogu u patogenezi, kao što su: reumatoidni artritis, psorijaza i ulcerozni kolitis (63,66,67).

Metotreksat je inhibitor dihidrofolat reduktaze (DHFR), enzima odgovornog za redukciju folata u njihov metabolički aktivan oblik tetrahidrofolata. Naime, smatra se da je smanjena sinteza timidilata iz deoksiuridilske kiseline osnova citotoksičnog delovanja metotreksata, jer je ovo jedina jedno-karbonska transferska reakcija u kojoj se oksidišu tetrahidrofolatni kofaktori u njihove inaktivne dihidrofolatne oblike (67). Metotreksat inhibira i nekoliko drugih enzima koji učestvuju u sintezi purina. Glavni mehanizam antikancerskog dejstva metotreksata se, prema tome, pripisuje inhibiciji sinteze DNK putem deplecije nukleotida i poremećaja inkorporacije dUMP u DNK, kao i u izvesnoj meri RNK (62,63,67,68). Drugi mehanizam delovanja izgleda da je višak vezujućih mesta na dihidrofolatnoj reduktazi, zato što je unutarćelijski nivo ovog target enzima 20 – 30 puta veći od onog koji je potreban da se održi neophodna koncentracija tetrahidrofolata (69).

Opisani su i novi mehanizmi delovanja metotreksata (70). Oni ukazuju da je bitna komponentna antiproliferativnog dejstva metotreksata inhibicija izoprenilcistein karboksil metiltransferaze, koja je odgovorna za karboksilmetilaciju G-protein Ras i njenu preciznu lokalizaciju u ćelijskoj membrani. Inhibicija remetilacije homocisteina preko metotreksata, folatnog antimetabolita, dovodi do porasta unutarćelijske koncentracije S-adenozilhomocisteina, koji je jak inhibitor

---

---

ćelijskih metiltransferaza (71). Inhibicija metiltransferaze vodi do prekida u Ras-označenom putu i prestanka rasta ćelije. Autori, međutim, ne poriču značaj tradicionalno prihvaćenog modela mehanizma delovanja metotreksata (70). Umesto toga, oni naglašavaju istinitost tvrdnje da „relativni značaj bilo kog izdvojenog mehanizma može biti diskutabilan od tumora do tumora i od ćelije do ćelije“. Bilo kakvo uplitanje u metabolički proces metilacije u ćeliji, može dovesti do poremećaja metilacije na nivou DNK, proteina i malih molekula kao što su poliamini, koji inače poseduju osobine regulatornih molekula (71). Prosesi koji se odvijaju u ćeliji nakon inhibicije sinteze DNK pod dejstvom metotreksata, još uvek nisu dovoljno ispitani. Za sada postoje samo sporadični izveštaji (72-74).

---

---

### 1.6.1. Homocistein kao marker efikasnosti antifolata

Uprkos dosadašnjem velikom napretku u razumevanju genetičkih i metaboličkih procesa kod kancera, još uvek se široko primenjuje koncept doziranja lekova prema telesnoj površini pacijenta. Na ovaj način se zanemaruje individualnost svakog pacijenta na nivou tumor – domaćin. Naime, postiže se preciznost u doziranju lekova ali izostaje neophodna biološka preciznost kada je reč o individualnim potrebama, prilagođavanju lekova svakom pacijentu ponaosob i vremenu trajanja ciklusa terapije. Zbog toga se tokom proteklih godina intenzivno traga za farmakološkim i drugim biomarkerima na polju prediktivne onkologije.

Pod optimalnim uslovima, marker biološkog odgovora na dati lek bi morao biti unapred određen prediktor toksičnosti ili efikasnosti leka, ili posedovati obe ove karakteristike. Homocistein bi mogao biti endogeni faktor koji ispunjava ove kriterijume. Dokazano je da metotreksat jasno menja koncentraciju homocisteina u ćelijama pacijenata, ali su dokazi o tome pre deskriptivni nego što se bave utvrđivanjem jasnih prediktivnih smernica. Tek kada je u kliničkoj praksi predstavljen pemetrexed („multitargetni antifolat“), po prvi put su objavljeni radovi sa inicijalnim, mada oskudnim, podacima koji se odnose na njegovo antifolatno delovanje i koncentraciju homocisteina i MMA u plazmi. Utvrđeno je da homocistein i MMA mogu biti markeri kojima se procenjuje toksičnost tokom terapije pemetrexedom (75,76). Naglašeno je da nadoknada folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> pre primene pemetrexeda može smanjiti toksičnost prouzrokovanu ovim lekom, kao i toksičnost tokom održavanja efekta leka ili možda povećanja doze leka. Iako zvuči optimistički, ovakav stav još uvek nije prihvaćan od strane većine naučnika. Međutim, istraživanja koja se u novije vreme bave vezom homocisteina i folatnih antagonista potvrđuju da je homocistein marker „farmakodinamskog dejstva“ metotreksata (77). Na to, između ostalog, ukazuje i činjenica da je kod pacijenata koji su primali visoke doze metotreksata, koncentracija homocisteina u plazmi imala paralelan razvoj i tok do skoro fatalne neurotoksičnosti. Koncentracije folne kiseline u plazmi, pre primene metotreksata, su se razlikovale kod pacijenata sa toksičnim i netoksičnim tokom ciklusa hemoterapije.



---

---

## 1.7. Hiperhomocisteinemija i bolesti kod dece

Postoje dve vrste dokaza o povezanosti homocisteina i kardiovaskularnih oboljenja u detinjstvu. Prvo, povišene koncentracije kod dece su u pozitivnoj korelaciji sa kardiovaskularnim oboljenjima kod njihovih roditelja (78-81), deda i baba (80,81) ili rođaka (82). Moguće je da takva udruženost odražava spoljašnje ili genetske faktore rizika. Drugo, utvrđeno je da je koncentracija homocisteina povezana sa moždanim udarom (53,83-85), kao i sa venskom trombozom kod novorođenčadi i dece (86). Ovi nalazi su veoma značajni jer postoje neprepoznati moždani udari u neonatalnom uzrastu i detinjstvu, sa nedovoljno definisanim faktorima rizika i neadekvatnim terapijskim protokolom (87). Ukoliko veće studije potvrde homocistein kao jasan faktor rizika, terapijski pristup bi mogao biti snižavanje koncentracije homocisteina primenom vitamin B kompleksa.

Značajno povećanje koncentracije ukupnog homocisteina je prisutno kod dece sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, kako kod one na hemodijalizi tako i kod one kod kojih se primenjuje peritonealna dijaliza, ali i kod dece kod koje je urađena transplantacija bubrega (88,89). Hiperhomocisteinemija je izraženija kod dece sa bubrežnom bolešću i MTHFR C677 T-alelom, nego kod onih sa CC genotipom (52,90), i ona imaju dobar odgovor na primenu visokih doza folne kiseline (88,91,92). Terapija folnom kiselinom dovodi do blage dilatacije i donekle popravlja protok, ali ne značajno u poređenju sa placebom (93). Još uvek je nejasno da li nadoknada folne kiseline ima povoljan efekat na kardiovaskularni sistem dece sa bubrežnom insuficijencijom.

Kod dece sa dijabetes melitusom tip I snižene su koncentracije homocisteina (94-98). Ovo sniženje bi se moglo objasniti glomerulskom hiperfiltracijom u ranoj fazi dijabetesa (99). Mlađi pacijenti nemaju razvijenu nefropatiju i druge komplikacije dijabetesa, čime se, inače, objašnjavaju visoke koncentracije homocisteina kod dece kod koje dijabetes melitus tip I duže traje (98) i kod starijih dijabetičara (100). Niske koncentracije kod dece u ranoj fazi dijabetesa upućuju na to da dijabetička angiopatija nije uzrokovana hiperhomocisteinemijom. Međutim, povišene vrednosti folne kiseline u eritrocitima kod ovih pacijenata udružene su sa boljim funkcionisanjem endotela, što se manifestuje boljim protokom krvi i nižim

---

---

koncentracijama trombomodulina (101). Nakon ovog otkrića, usledila su brojna istraživanja sa ciljem da se utvrdi da li folna kiselina poboljšava funkciju endotela kod dece sa dijabetesom.

Snizene koncentracije folne kiseline i izmenjen metabolizam homocisteina prisutni su kod kongenitalnih anomalija, kao što su defekti neuralne tube i Dawnov sindrom (102). Najbolja potvrda da metabolizam folne kiselina igra glavnu ulogu u nastanku defekta neuralne tube, bilo je smanjenje incidencije ove anomalije 50 - 70% nakon uvođenja profilakse folnom kiselinom. Poremećen folatni status i povišena koncentracija homocisteina zapaženi su kako kod obolele dece, tako i kod njihovih majki (103). Udruženost defekta neuralne tube i polimorfizma enzima koji su uključeni u jedno-karbonski mehanizam, kao što je MTHFR (104), dodatno je potvrdila etiološki značaj disfunkcionalnog metabolizma folata.

Niska koncentracija homocisteina kod dece sa Downovim sindromom zapažena je pre više od 20 godina (105). Utvrđeno je da je kod Downovog sindroma povećana degradacija homocisteina putem transulfuracije. Ovakav povećan protok se objašnjava povećanom aktivnošću cistation- $\beta$ -sintaze koji je smešten na hromozomu 21. Ispitivano je da li je nizak homocistein u vezi sa smanjenom učestalošću oboljevanja od ateroskleroze kod dece sa Downovim sindromom i da li smanjena degradacija homocisteina utiče na unutarćelijsku distribuciju folata, što bi moglo objasniti povećanu osetljivost na metotreksat, povećan srednji korpuskularni volumen eritrocita, malapsorpciju gastrointestinalnog trakta i poremećenu sintezu DNK i zbog toga povećanu incidenciju od leukemije (106). Dokaz o učešću folatnog metabolizma kod Downovog sindroma pruža i podatak da je povećana učestalost MTHFR 677T i MTRR 66 G alela kod majki čija deca imaju Downov sindrom (107-109) .

---

---

## 1.8. Hiperhomocisteinemija i karcinogeneza

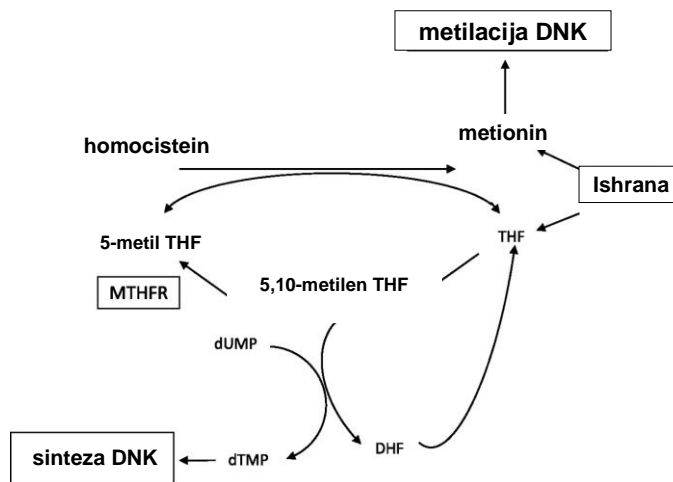
### 1.8.1. Mehanizam hiperhomocisteinemija – karcinogeneza

Tokom proteklih nekoliko godina jasno je utvrđena povezanost povišenih vrednosti homocisteina u plazmi u pojave određenih kancera. Međutim, mehanizam karcinogenog dejstva homocisteina još uvek nije precizno utvrđen. Na bazi postojećih podataka, još uvek ne može da se precizno odredi koliko pojavi karcinogeneze doprinosi hiperhomocisteinemija, a koliko snižene koncentracije folne kiseline i vitamina B<sub>6</sub> i B<sub>12</sub>, ili je možda genetska predispozicija u osnovi oba ova fenomena. Dok jedni autori nalaze jasnu povezanost koncentracije homocisteina i rasta tumora (110), drugi su razvili teorije po kojima homocistein ispoljava svoj karcinogeni efekat tako što se uključuje u metaboličke puteve drugih jedinjenja, npr. hormona (111) ili dovodi do oštećenja DNK (112). S obzirom da ne postoji dovoljan broj podataka da bi se izveli zaključci o značaju dugotrajno sniženog homocisteina u prevenciji i terapiji maligniteta, neophodna su nova istraživanja. Potpuno je neistražena oblast o uticaju hiperhomocisteinemije na pojavu tumora embrionalnog porekla, koji su karakteristika dečjeg uzrasta. Oskudna ispitivanja na polju homocisteina i maligniteta dečjeg uzrasta rađena su uglavnom kod akutnih limfoblastnih leukemija, vezano za terapijsku primenu metotreksata, antagonista folne kiseline.

Većina dosadašnjih istraživanja se bazira na činjenici da je metabolizam homocisteina bitan u procesu karcinogeneze. Poznato je da se homocistein u ćelijama normalno metaboliše putevima metilacije i transsulfuracije. Promene u oba ova puta mogu biti razlog pojave maligne transformacije ćelija.

Procesom metilacije, homocistein se metiliše u metionin (u reakciji koja uključuje B<sub>12</sub>-zavisni enzim (metionin sintaza)) i 5-metil-tetrahidrofolat (5-metil-H<sub>4</sub>PteGlu), koji doniraju svoje metil grupe homocisteinu. Nastanak 5-metil-H<sub>4</sub>PteGlu u ćeliji katalizuje enzim 5,10-metilen-tetrahidrofolat reduktaza (MTHFR). Polimorfizam enzimske aktivnosti MTHFR može modifikovati individualni rizik za nastanak maligniteta. U literaturi se navode dva mehanizma – hipometilacija DNK i misinkorporacija uracila u DNK (Slika 4). Ova dva mehanizma se najčešće dovode

u vezu sa nastankom maligniteta (113-117). Smanjena funkcija MTHFR enzima dovodi do smanjenja dostupnosti 5-metil- $H_4$ PteGlu, dovodeći na taj način do smanjene konverzije homocisteina u metionin (Slika 4). Potrošnja folata ima za posledicu hipometilaciju DNK, što može da ima uticaj na dalji razvoj i funkcionisanje ćelije. Svaka nepravilnost metilacije DNK može biti udružena sa procesom karcinogeneze (114,118,119). Osim toga, zbog manjka folata, snižena je koncentracija 5,10-metilen-tetrahydrofolata, zbog čega se smanjeno sintetiše timidilat deoksitimidin monofosfat. To povećava odnos deoksiuridil monofosfat/deoksitimidin monofosfat, što pospešuje misinkorporaciju uracila. Ovaj proces dovodi do oštećenja DNK (npr. tačkaste mutacije i prekidi hromozoma), što bi moglo biti udruženo sa karcinogenezom (113).



Slika 4. Šematski prikaz metabolizma folata. DHF, dihidrofolat; dTMP, deoksitimidin monofosfat (deoksitimidilat); dUMP, deoksiuridin monofosfat (deoksiuridilat); MTHFR, metilenetetrahydrofolat reduktaza; THF, tetrahydrofolat. (Preuzeto iz Kono i Chen (117)).

---

---

Značaj uloge MTHFR (da omogući uključivanje 5- metil- $H_4PteGlu$  u ciklus metilacije) potvrđen je činjenicom da kod izvesnog broja odraslih osoba sa hiperhomocisteinemijom, polimorfizam u okviru folat-vezujućih grupa (kao što je C→T supstitucija na nukleotidu 677, koja konvertuje alanin u valin) dovodi do nastanka disfunkcionalnog termolabilnog MTHFR. Ovo dovodi do patološkog nagomilavanja homocisteina, koji napušta ćeliju i prelazi u cirkulaciju. Varijanta 677 C→T je udružena sa visokim bazalnim vrednostima homocisteina u serumu. Navedeni polimorfizam je udružen sa povećanim rizikom od nastanka endometrijalnog karcinoma, raka dojke, ovarijalnog karcinoma, karcinoma jednjaka i želuca a nosi smanjen rizik od leukemije i kolorektalnog karcinoma (120-123). Osim slabo funkcionalne polimorfne T varijante MTHFR na nukleotidu 677 (677 C→T) postoji i slabo funkcionalna C varijanta na nukleotidu 1298 (1298 A→ C) (124,125). Smanjen rizik od karcinoma kolona imaju osobe sa MTHFR 677 TT genotipom (126-128), dok je niži rizik od akutne limfoblastne leukemije kod dece i odraslih udružen sa mutacijama MTHFR 677 C→T i 1298 A→ C (129,130). Međutim, ovaj zaštitni efekat je prisutan samo ukoliko je unos folata adekvatan, dok u uslovima bez folata pomenute varijante nose isti rizik od karcinogeneze kao i divlji tipovi (131). Moguće je da metilacija 5-metil THF, u cilju održanja balansa korisnog efekta redukovane misinkorporacije uracila, u takvim uslovima postaje kritična. Pretpostavka je da se rizik od kancera udružen sa polimorfizmom MTHFR može menjati pod uticajem folata.

Postoji naizgled dovoljno prikupljenih dokaza da niske koncentracije folata dovode do karcinogeneze. Vezu između niskog folatnog statusa i maligniteta potvrđuju brojne epidemiološke studije; utvrđena je na životinjskim modelima i *in vitro* istraživanjima, a mogući mehanizmi ove povezanosti se još uvek kritički procenjuju. Kako je već ranije navedeno, mogući mehanizmi bi mogli biti poremećaj metilacije DNK, nestabilnost DNK usled preloma lanaca ili greške pri ugrađivanju uracila u DNK. Metilacija citozina (u 5-metil-deoksicitidin) u DNK se može javiti u kodirajućoj regiji gena (što može biti inicijalni događaj koji dovodi do mutacija tumor supresor gena) ili unutar citozina na poziciji CpG regije unutar promotera (gde će metilacija dovesti do prigušenja tumor supresor gena, a hipometilacija do aktivacije protoonkogeno). Istraživanja ukazuju da metilacija prigušuje gensku

---

---

ekspresiju putem acetilacije histona koji je uključen u transkripcionu represiju (132). Nasuprot tome, hipometilacija DNK pospešuje represiju, dovodeći do aktivacije gena. Značajno je to da su takve epigenetske promene (hipometilacija) zapažene i eksperimentalno na ljudskim leukocitima i tokom karcinogeneze prilikom progrediranja adenoma u kancer kolona. Podjednako je značajno da se pritom, uz pojavu adenoma, pojavljuju i nove promene na normalnoj rektalnoj mukozii. Velika učestalost termolabilnog MTHFR u opštoj populaciji, omogućava da se istražuju mogući faktora rizika udruženi sa karcinogenezom i promenjenim folatnim statusom. MTHFR je uključen i u nastanak 5-metil-H<sub>4</sub>PteGlu. U uslovima njegove termolabilnosti, postoji sklonost ka preusmeravanju njegove jedno-karbonske grupe u 5,10-metilen-H<sub>4</sub>PteGlu putu, pri čemu se stvara više timidilata za DNK sintezu (što je dokazano u eritrocitima), pod uslovom da je folatni status normalan. Zbog toga, osobe koje su homozigoti za MTHFR imaju rizik od 50% da obole od kancera kolona (pod uslovom da imaju normalnu koncentraciju folata, koji optimizira preusmeravanje). Ovi nalazi upućuju na to da je koncentracija folata tokom puta sinteze timidilata, a na račun procesa metilacije, od neprocenjivog značaja za zaštitu DNK. Kod pojedinaca sa homozigotnim termolabilnim MTHFR i niskim folatnim statusom, 5,10-metilen-H<sub>4</sub>PteGlu ne može da stabilizuje flavin adenin nukleotid kofaktor na vezujućim mestima za MTHFR i dolazi do smanjenja njegove enzimske aktivnosti. Deficit folata predisponira hipometilaciju DNK, što može predstavljati rizik za pojavu karcinogeneze. Na ovaj način se, između ostalog, može objasniti veza između termolabilnosti MTHFR i rizika od nastanka maligniteta (131).

Sa ciljem da se odgovori na pitanje da li je homocistein uzročnik karcinogeneze ili je hiperhomocisteinemija samo pasivni i indirektni indikator mnogo kompleksnijeg mehanizma, proučavana je i uloga S-adenozilmetionina (SAM) i S-adenozilhomocisteina (SAH). Kako su ova jedinjenja supstrati reakcija u kojima učestvuje metiltransferaza, oni su bitni metabolički indikatori metilacionog statusa ćelije. Dugotrajno povišene koncentracije homocisteina dovode do paralelnog povećanja unutarćelijskog SAH i značajno inhibiraju DNK metiltransferaze. Hipometilacija DNK posredovana povišenim koncentracijama SAH je udružena sa poremećajima u ekspresiji gena i strukturi hromatina, te bi

---

---

mogla biti osnova nove hipoteze u patogenezi bolesti udruženih sa hiperhomocisteinemijom (133).

Da bi se razjasnilo da li homocistein ima karcinogeni potencijal, ispitivan je i mehanizam oksidativnog DNK oštećenja. Proučavano je jedinjenje 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oxodG), za koje je poznato da dovodi do karcinogeneze, a indukuje ga homocistein u kulturi ćelija. Homocistein dovodi do povećanja koncentracije ovog jedinjenja u leukemijskim ćelijama, dok koncentracija nije povećana u kolonijama klonalnih ćelija koje su rezistentne na dejstvo hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Korišćeni su fragmenti DNK dobijeni iz humanih tumor supresor gena i protoonkogeni i utvrđeno je da postoje dva mehanizma kojima homocistein dovodi do oštećenja DNK u prisustvu  $Cu(II)$ . Pri niskim koncentracijama homocisteina ( $20 \mu\text{mol/L}$ ), povećava se broj piperidin-labilnih mesta na reziduama timidina, dok visoke koncentracije homocisteina ( $100 \mu\text{mol/L}$ ) primarno dovode do oštećenja na reziduama guanina. Katalaza inhibira oštećenje DNK ukoliko su koncentracije homocisteina niske ( $20 \mu\text{mol/L}$ ), nagoveštavajući ulogu  $H_2O_2$ , ali je potpuno neefikasna u prevenciji oštećenja DNK kada su koncentracije homocisteina visoke ( $100 \mu\text{mol/L}$ ). Eksperiment u kome je primenjen set kiseoničnih proba pokazao je da koncentracija homocisteina od  $100 \mu\text{mol/L}$  pojačava intenzitet hemiluminiscencije u deuterijum oksidu više nego u  $H_2O$ . Ovakvi rezultati ukazuju da bi DNK oštećenje zavisno od prisustva metala preko  $H_2O_2$  moglo biti bitan mehanizam karcinogenog delovanja homocisteina (112).

Poremećaji u procesu transulfuracije homocisteina takođe bi mogli biti od značaja za pojavu karcinogeneze. Procesom transulfuracije, cistation  $\beta$ -sintaza katalizuje kondenzaciju homocisteina sa serinom u prisustvu piridoksil fosfata (vitamin  $B_6$ ), pri čemu nastaje cistation, koga vitamin  $B_6$ -zavisna  $\gamma$ -cistationaza dalje raščlanjuje na cistein i  $\alpha$ -ketobutirat. Cistein učestvuje u sintezi antioksidanta glutaciona, glavnog unutarćelijskog faktora odbrane od oksidativnog stresa. Ograničavajući reagens u sintezi glutaciona je cistein, a oko 50% cisteina u jetri nastaje procesom transulfuracije. Metabolizam homocisteina je povezan sa rezervama glutaciona i čini se da postoji recipročna oksidativna senzitivnost između aktivnosti metionin sintaze i cistation  $\beta$ -sintaze. Oksidativni stres inaktiviše metionin

---

---

sintazu, povećava se nivo homocisteina procesom transulfuracije i proizvodi se više cisteina i glutationa; nasuprot tome, antioksidanti dovode do suprotnog efekta.

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da koncentracija homocisteina u plazmi zavisi od genetski regulisanih koncentracija esencijalnih enzima i unosa folne kiseline, vitamina B<sub>6</sub> i vitamina B<sub>12</sub>, ali i od drugih faktora (bubrežne disfunkcije, starosti, NO i antifolata).

Samim tim, nameće se činjenica da se rizik od karcinogeneze može smanjiti povećanjem unosa folata u ishrani. Još uvek je, međutim, nedovoljan broj kliničkih studija koje potvrđuju izvesni napredak ili promenu krajnjih surogat markera. Pa ipak, kod životinja je dokazano da nadoknada folata povećava rizik od kolorektalnog kancera i ubrzava progresiju kancera. To nalaže oprez i dugoročni pažljiv monitoring populacija, a naročito onih kod kojih je uveden program fortifikacije hrane. Međutim, u naučnim krugovima, i dalje je prihvaćen stav da se povećanim unosom folata smanjuje rizik od nastanka kolorektalnog kancera (134).

Iako postoji mnogo studija na životinjama i ljudima koje izučavaju značaj folata u DNK hipermetilaciji CpG regiona koja dovodi do transkripcijskog prigušivanja tumor supresor gena ili globalne hipometilacije, ne postoji jasna potvrda da fiziološki deficit folata dovodi do značajnih promena u DNK hipometilaciji genoma ili da specifična DNK metilacija određenih gena utiče na pojavu maligniteta. Štaviše, zbog obilja proučenih životinjskih modela, zaključci koji se odnose na humanu populaciju moraju biti prihvaćeni sa oprezom. Zbog toga, uprkos brojnim eksperimentalnim potvrdama o tome da deficit ili višak folata imaju uticaj na transformaciju normalne ćelije u malignu i postojanju nekoliko retrospektivnih i par prospektivnih epidemioloških studija koje potvrđuju vezu između deficita folata i rizika od kancera, ne postoji pouzdan pokazatelj u ljudskoj populaciji na osnovu kojeg bi se mogla napraviti jasna veza između hrane i kancera.



---

---

### 1.8.2. Hiperhomocisteinemija i malignitet kod dece

Nedovoljno se zna o etiologiji i mehanizmu malignih bolesti kod dece. Široki spektar molekularne raznolikosti ovih bolesti ukazuje na to da su u etiologiji ovih tumora uključene brojne složene interakcije. Međutim, tokom proteklih decenija, napravljen je značajan pomak u razumevanju molekularne osnove maligniteta dečjeg uzrasta. Mehanizam nastanka akutne leukemije kod dece uključuje hiperdiploidiju, aberantnu ekspresiju protoonkogeno i aktivaciju transkripcionih faktora ili kinaza putem aberantne fuzije gena. Molekularne analize ovih poremećaja su olakšale prepoznavanje grupa sa različitom senzitivnošću na terapiju i identifikovale potencijalne mete za antileukemijske lekove. Slične analize na polju mekotkivnih tumora i tumora kostiju kod dece, takođe su dovele do identifikacije specifičnih fuzija gena, a njihove osobine su značajno doprinele boljem razumevanju njihove specifične biologije. Molekularni esej njihovih rearanžmenta je postao bitno sredstvo klasifikacije ovih bolesti i dobar prognostički faktor. Međutim, razumevanje mehanizama koji su u osnovi mnogih drugih malignih bolesti dečjeg uzrasta, uključujući i embrionalne tumore, još uvek je uglavnom nekompletno. Uprkos tome sto su opisane mnoge citogenetske i molekularne abnormalnosti, njihova patogeneza je još uvek nejasna.

Smatra se da embrionalni tumori nastaju zbog grešaka u razvoju tokom embrionalnog i fetalnog sazrevanja. Jedna od hipoteza je da se stvara više ćelija nego što je potrebno za formiranje određenih organa ili tkiva i da ove rudimentne ćelije u višku predstavljaju osnovu za nastanak maligniteta. Pojava embrionalnih tumora nakon dojenačkog perioda, objašnjava se perzistiranjem ovih ćelija ili njihovih razvojnih tragova. Razvojne anomalije tkiva (npr. hamartoma ili disgenetičkih gonada) razlog su pojave maligniteta u kasnijem uzrastu. Prisustvo ovog poremećenog razvojnog tkiva na rođenju, dokaz je da ćelije nisu maturirale, migrirale, ili se nisu pravilno diferentovale tokom intrauterinog perioda.

Maligna transformacija ćelija u kulturi tkiva i *in vivo* karcinogenezi je dinamičan, postepen i složen proces koji, uprošćeno, prolazi kroz tri faze: inicijaciju, promociju i progresiju. Ove faze se praktično mogu primeniti na sve tumore, uključujući i embrionalne. Inicijacija je posledica izlaganja ćelija ili tkiva

---

---

odgovarajućoj dozi karcinogena, pri čemu se inicirajuća ćelija trajno oštećuje i dobija maligni potencijal. Inicirajuća ćelija može perzistirati mesecima ili čak godinama pre nego što postane maligna. Tokom faze promocije, inicirajuća ćelija se klonalno razvija. Promociju mogu modifikovati ili učiniti je reverzibilnom brojni faktori. Tokom poslednje faze, progresije, transformisana ćelija se razvija u tumor, sa sposobnošću metastaziranja. Embrionalni tumori se, samim tim, mogu smatrati poremećajem integrisane kontrole ćelijske diferencijacije i proliferacije. Genetički model karcinogeneze je predstavljen sa ciljem da se objasne patogeneza i osobenosti određenih embrionalnih tumora. Prema ovoj hipotezi, embrionalni tumori su rezultat dva mutaciona događaja u genomu. Prva mutacija je prezigotna i nije nasledna, dok je druga uvek postzigotna.

Određeni neonatalni i dojenački tumori imaju benigno kliničko ponašanje iako su histološki maligni, kao što je to slučaj kod neuroblastoma i hepatoblastoma u prvoj godini života i kod kongenitalne i infantilne fibromatoze i sakrokokcigealnog teratoma u prvih nekoliko meseci života. Faktori koji su odgovorni za benigni tok onkogenog perioda ovih tumora nisu poznati.

Kad je reč o udruženosti maligniteta i kongenitalnih malformacija, dobro je dokumentovan koncept po kome teratogeneza i karcinogeneza imaju iste mehanizme. Smatra se da je u osnovi ovih procesa simultana ili postepena reakcija ćelija ili tkiva na specifične štetne agense. Stepem diferencijacije ćelija, metaboličko ili imunološko stanje fetusa ili embriona, kao i vreme izloženosti agensu, određiće da li će efekat biti teratogen, karcinogen, da li će se javiti oba ili nijedan. Mnogi biološki, hemijski i fizički agensi, za koje se zna da su teratogeni za embrion i fetus, su kancerogeni u kasnijem životnom dobu. Pretpostavlja se da anomalna tkiva poseduje latentne onkogene koji se aktiviraju pod određenim uslovima i dovode do maligne transformacije tumora.

Molekul folne kiseline učestvuje u sintezi DNK i metilaciji. Brojna istraživanja na odraslima ukazuju na povezanost između rizika od maligniteta i deficita folata, a takođe i na pojačanu sklonost oštećenja genoma. Značajnija istraživanja kod dece nisu rađena, a postoji mali broj izveštaja koji ukazuju na povezanost homocisteina i folne kiseline, kofaktora u njegovoj sintezi, i pojave maligniteta kod dece (17,18,135-139).

---

---

Osnovu intergriteta genoma čini nekoliko molekularnih mehanizama senzitivnih na vitamine B kompleksa, kao i na interakciju između unosa folata i polimorfizma enzima zavisnih od folne kiseline (140). Pacijenti sa MTHFR 677 TT i adekvatnim unosom folata imaju snižen rizik za nastanak akutne limfoblastne leukemije (141). Poremećaj distribucije folata prouzrokovan različitim oblicima MTHFR utiče na rizik od limfoblastne leukemije ali ne i na rizik od mijeloidne leukemije. Moguće je da limfoidne i mijeloidne ćelije imaju različite potrebe za folatima ili različitu osetljivost na oštećenja hromozoma. U osnovi toga mogu biti povećani zahtevi za folatima kod limfoidnih ćelija u odnosu na mijeloidne (142). Rezultati istraživanja potvrđuju značaj koncentracije homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> u akutnoj limfoblastnoj leukemiji, naglašavajući da interakcija gen – okruženje može biti značajan faktor u razvoju akutne limfoblastne leukemije (139). Takođe je utvrđeno da nadoknada folata tokom trudnoće značajno smanjuje rizik od nastanka akutne limfoblastne leukemije u detinjstvu (138).

Kada je reč o limfomima u dečjem uzrastu, nađeno je i da su i kod njih koncentracije homocisteina značajno povišene, ali ne u toj meri kao kod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije. Koncentracije su se normalizovale kada je postignuta remisija bolesti (135).

Pretpostavlja se da je transportni sistem visokog afiniteta za folnu kiselinu prekomerno aktiviran u kulturi leukemijskih i drugih malignih ćelija, čime se mogu objasniti povećani zahtevi za folnom kiselinom za *de novo* sintezu nukleotidnih prekursora. Nađeno je da leukemijske ćelije pacijenata sadrže veću koncentraciju folata nego neleukemijske ćelije u sličnom stadijumu razvoja, kao i da je odnos između folata u leukocitima i serumu značajno povećan. Na osnovu toga je zaključeno da postoje povećani zahtevi za folnom kiselinom kod leukemija i solidnih tumora, što je praćeno smanjenjem koncentracije folata u serumu i smanjenim katabolizmom i ekskrecijom folata. Analiza promena u koncentraciji homocisteina pre i tokom terapije akutne limfoblastne leukemije, upućuje na to da bi koncentracija ukupnog homocisteina u plazmi mogla biti potencijalno koristan indikator folatnog statusa pacijenata (18). Još uvek ne postoje dokazi da li može biti prognostički faktor i parametar praćenja terapijskog efekta.

---

---

Istraživanjem značaja homocisteina na razvoj embrionalnih tumora centralnog nervnog sistema, nađeno je da homozigoti za CC alel MTHFR A1298C imaju povećan rizik za razvoj ovih tumora i da metabolizam folata može imati značajnu ulogu u patogenezi specifičnih podtipova tumora mozga kod dece. Što se tiče drugih analiziranih tipova tumora mozga u dečjem uzrastu (tumori glije i germ cell tumori), nije utvrđena povezanost polimorfizma i njihovog nastanka (136).

---

---

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi odnose između vrednosti u krvi homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> sa vrstom i stadijumom maligne bolesti.

2. Utvrditi efekte primenjene terapije na promene u vrednostima homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub>.

3. Utvrditi značaj homocisteina kao mogućeg markera tumorske aktivnosti.

---

---

### 3. MATERIJAL I METOD ISTRAŽIVANJA

Prospektivno istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu i Etičkog odbora Instituta za majku i dete Republike Srbije „Dr Vukan Čupić“ i sprovedeno je u skladu sa etičkim standardima.

Koncentracije homocisteina u plazmi, vitamina B<sub>12</sub> u serumu i folne kiseline u serumu određene su kod 46 dece sa novodijagnostikovanim malignim oboljenjem u Institutu za majku i dete Republike Srbije „Dr Vukan Čupić“ u periodu od 1. jula 2009. godine do 1. januara 2011. godine.

Kriterijumi za uključenje u studiju su bili sledeći:

1. Pacijenti sa potvrđenom dijagnozom: a) malignog solidnog tumora (Wilmsov tumor, neuroblastom, ganglioneuroblastom, rabdomiosarkom, hepatoblastom, tumori germinativnih ćelija, primitivni neuroektodermalni tumor, adrenokortikalni karcinom, osteosarkom); b) limfoproliferativnog ili plazmaćelijskog oboljenja (akutne limfoblastne leukemije, akutne i hronične nelimfoblastne leukemije, mijelodisplaznog sindroma, Langerhans cell histiocitoze, Hodgkinovog i Nehodgkinskih limfoma).
2. Pacijenti koji: a) su dijagnostikovani pre 18. rođendana, b) imaju histopatološki, imunohistohemijski ili metodama molekularne dijagnostike potvrđenu dijagnozu malignog oboljenja, c) nisu ranije bolovali od malignog oboljenja, d) nisu u terminalnom stadijumu bolesti.
3. Roditelji (majka ili otac) ili primarni staratelji pacijenata su dali pismenu saglasnost.

Dijagnoza je kod svih pacijenata obolelih od malignih solidnih tumora potvrđena histopatološkom analizom bioptata ili ekstirpiranog tumora, dok je kod pacijenata sa limfoproliferativnim malignim oboljenjima potvrđena metodama imunohistohemije i molekularne dijagnostike.

Svi ispitanici su svrstani u sledeće uzrastne grupe: 0 – 1, 2 – 3, 4 – 6, 7 – 9, 10 – 12 i 13 – 18 godina.

---

---

Registrovana maligna oboljenja u ispitivanoj populaciji dece su, prema embrionalnom poreklu, svrstana u sledeće kategorije: ektodermalnog, mezodermalnog, endodermalnog i mešovitog porekla. U maligne tumore ektodermalnog porekla, koji nastaju iz epitela i udruženih struktura, kao i nervnog tkiva, svrstani su: neuroblastom (NB), primitivni neuroektodermalni tumor (PNET) i adrenokortikalni karcinom (ACC). U maligne tumore mezodermalnog porekla, koji nastaju iz mišića, spoljašnjih omotača unutrašnjih organa, gonada, urogenitalnog i ekskretornih sistema, kao i mezenhima (dermis – unutrašnji sloj kože, kosti i hrskavica i cirkulatorni sistem – srce, krvni sudovi i eritrociti), svrstani su: Wilmsov tumor (WT), rabdomiosarkom (RMS), osteosarkom, Hodgkinov limfom (HL), Nehodgkinski limfom (NHL), akutna limfoblastna leukemija (ALL), akutna mijeloidna leukemija (AML), hronična mijeloidna leukemija (CML), mijelodisplazni sindrom (MDS) i histiocitoza. U maligne tumore endodermalnog porekla, koji nastaju iz unutrašnjeg sloja digestivnog trakta, respiratornog trakta i žlezda (uključujući jetru i pankreas), svrstani su: hepatoblastom (HB), Yolk Sac karcinom (YSCa) i embrionalni karcinom testisa. U maligne tumore mešovitog porekla svrstani su: maligni Schwanom (MPNST) i nezreli teratom (oba su ektomezenhimalnog porekla).

Maligna oboljenja ispitanika su, prema vrsti maligniteta, dalje podeljena na solidne tumore i limfoproliferativna i plazmaćelijska maligna oboljenja. U grupu solidnih tumora svrstani su: NB, PNET, ACC, WT, RMS, osteosarkom, HB, tumori germinativnih ćelija (YSCa, embrionalni karcinom testisa i nezreli teratom) i MPNST. U grupu limfoproliferativnih i plazmaćelijskih malignih oboljenja svrstani su: HL, NHL, ALL, AML, CML, MDS i histiocitoza.

Kada je reč o lokalizaciji tumora kod obolele dece, maligna oboljenja su klasifikovana prema zahvaćenim organima i sistemima organa u organizmu na: urinarni, genitalni, digestivni, nervni, lokomotorni i endokrini sistem, limfatično tkivo i organe i kostnu srž.

Inicijalne vrednosti koncentracije homocisteina u plazmi, vitamina B<sub>12</sub> u serumu i folne kiseline u serumu su određivane pre sprovođenja bilo kakve terapije. Kontrolne vrednosti koncentracije homocisteina u plazmi, vitamina B<sub>12</sub> u serumu i

---

---

folne kiseline u serumu su određivane nakon sprovedene terapije (operativnog lečenja, hemioterapije i radioterapije).

Uzimanje uzoraka krvi za određivanje homocisteina je obavljeno prema standardizovanom protokolu. Venepunkcije su kod pacijenata rađene u jutarnjim satima, između 8h i 10h, pre doručka. Krv za određivanje homocisteina (3 – 4 ml) je sakupljana u epruvete sa EDTA, dok je krv za određivanje vitamina B<sub>12</sub> i folne kiseline (2 – 3 ml) sakupljana u epruvete bez dodatka antikoagulansa. Uzorci krvi su potom centrifugirani, separisani i zamrzavani na -20°C unutar 1 čas nakon venepunkcije, do analiziranja. Kod svih pacijenata kod kojih je određena koncentracija homocisteina, određene su i koncentracije folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub>. Homocistein je određivan na aparatu ACL Elite Pro, metodom automatskog lateksom obogaćenog imunoeseja za kvantitativno određivanje ukupnog L-homocisteina u humanoj citriranoj plazmi, pri čemu je korišćen faktor konverzije 1,17 ( $Hcy_{EDTA} / 1,17 = Hcy_{citrat}$ ), prema uputstvu proizvođača. Vitamin B<sub>12</sub> i folna kiselina u serumu su simultano određivani tehnikom hemiluminiscentnog eseja na aparatu Access Immunoassay (Beckman Coulter, USA) prema uputstvu proizvođača.

Demografske i kliničke karakteristike pacijenata su analizirane metodama deskriptivne statistike (srednja vrednost, standardna devijacija, minimalne i maksimalne vrednosti, procenat). U zavisnosti od distribucije podataka primenjivane su metode parametarske i neparametarske statistike (hi-kvadrat test, t-test, t par-test, Mann-Whitney test, analiza varijanse (ANOVA, Bonferoni post-hock test, Pearson i Spearman korelacija)). Rezultati su prikazani grafički i tabelarno. Kao statistički značajna uzeta je verovatnoća nulte hipoteze manja od 0,05. Baza podataka je formirana na računaru lap-top MSI u statističkom paketu SPSS-12.0 u kome je i izvršena statistička analiza dobijenih rezultata.



---

---

## 4. REZULTATI

### 4.1. Opšte karakteristike ispitivane grupe

**Tabela 1.** Demografske, kliničke i patološke karakteristike pacijenata sa malignim bolestima (N=46) uključenih u istraživanje.

Varijabla	Pacijenti
Demografske i kliničke karakteristike	
Pol , No (%)	
Muški (M)	25 (54)
Ženski (Ž)	21 (46)
Uzrast u vreme dijagnoze, godine, medijana (raspon)	7,16 (0,16-17,91)
Vrsta maligniteta, No (%), M No (%), Ž No (%)	
Solidni tumor (ST)	29 (63), 13 (52), 16 (76,2)
Limfoproliferativne/plazmaćelijske bolesti (LB)	17 (37), 12 (48), 5 (23,8)
Vrsta maligniteta, 0-1 g, No(%); 2-3g, No(%); 4-6g, No(%); 7-9g, No(%); 10-12g, No(%); 13-18g, No (%)	
ST	5 (17,2); 9 (31) ; 2 (6,9); 2 (6,9); 2 (6,9); 9 (31)
LB	0 (0); 3 (17,6) ; 0 (0); 3 (17,6); 6 (35,3); 5 (29,5)
Lokalizacija maligniteta, No (%)	
Urinarni sistem	4 (8,7)
Genitalni sistem	10 (21,7)
Nervni sistem	9 (19,6)
Lokomotorni sistem	4 (8,7)
Endokrini sistem	1 (2,2)
Limfatično tkivo i organi	2 (4,3)
Kostna srž	14 (30,5)
Digestivni sistem	2 (4,3)
Tumorski markeri, normalni, No (%); pozitivni, No (%)	
AFP	12 (50); 12 (50)
β-hCG	5 (83,3); 1 (16,7)
VMA i HVA u urinu	10 (62,5); 6 (37,5)

---



---

Patološke karakteristike	
Razvojna histogeneza, No (%)	
Ektodermalnog porekla	12 (26,1)
Endodermalnog porekla	5 (10,9)
Mezodermalnog porekla	27 (58,7)
Mešovitog porekla	2 (4,3)

---

AFP = Alfa-fetoprotein;  $\beta$ -hCG = Humani horionski gonadotropin;

VMA = Vanililmandelična kiselina; HVA = homovanilna kiselina

---

Kako se iz tabele 1 može videti, ispitanu grupu je činilo 46 ispitanika od kojih 25 (54%) ispitanika muškog pola i 21 (46%) ženskog pola.

Statističkom analizom podataka o polu ispitanika prikazanih u tabeli 1, nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji po polu ( $\chi^2=0,348$ ;  $p>0,05$ ).

U tabeli 1 je takođe prikazan uzrast ispitanika u vreme dijagnostikovanja malignog oboljenja. Uzrast ispitanika u vreme dijagnostikovanja malignog oboljenja se kretao u rasponu od minimalnih 2 meseca (0,16 godina) do maksimalnih 215 meseci (17, 91 godina) sa srednjom vrednosti 86 meseci (7,16 godina).

Nađena je vrlo visoko statistički značajna razlika starosti ispitanika u ispitivanoj grupi ( $t=9,130$ ;  $p<0,001$ ).

Istraživanje je obuhvatilo decu sa različitim vrstama maligniteta, tj. ispitanici su grupisani u zavisnosti od toga da li imaju solidni tumor ili limfoproliferativno, tj. plazmaćelijsko oboljenje. Najveći broj ispitanika (63%) je imao solidni tumor, dok je manji broj obolele dece imao (37%) limfoproliferativno ili plazmaćelijsko maligno oboljenje.

Statističkom analizom podataka o vrsti tumora u ispitivanoj grupi nije nađena statistički značajna razlika ( $\chi^2=3,130$ ;  $p>0,05$ ).

U tabeli 1 prikazana je i distribucija starosnih grupa ispitanika prema vrsti maligniteta. Kako se iz tabele može videti, solidni tumori su bili najzastupljeni u uzrastu 2 – 3 godine (31%) kao i u uzrastu 13 – 18 godina (31%).

---

---

Limfoproliferativni i plazmaćelijski maligniteti su bili najzastupljeniji u uzrastu 10 – 12 godina (35,3%).

Statističkom analizom distribucije starosnih grupa ispitanika prema vrsti maligniteta podataka prikazanih u tabeli 1, nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji starosnih grupa zavisno od vrste tumora ( $\chi^2=10,958$ ;  $p>0,05$ ).

Ispitanici sa limfoproliferativnim i plazmaćelijskim malignim oboljenjima su bili stariji u vreme postavljanja dijagnoze ( $115,8 \pm 50,9$  meseci) u odnosu na ispitanike sa solidnim tumorima ( $78,8 \pm 74,7$  meseci).

Uzrast se nije statistički značajno razlikovao između ispitanika sa solidnim tumorima i limfoproliferativnim i plazmaćelijskim malignitetima ( $t=-1,811$ ;  $p>0,05$ ).

S obzirom na veliku histopatološku raznovrsnost maligniteta u ispitivanoj populaciji, maligna oboljenja smo dalje klasifikovali prema lokalizaciji na kojoj su se primarno pojavili (urinarni sistem, genitalni sistem, nervni sistem, lokomotorni sistem, endokrini sistem, digestivni sistem, limfatično tkivo i organi i kostna srž). Analizom distribucije lokalizacije tumora u ispitivanoj grupi (tabela 1), utvrđeno je da su najzastupljeniji bili maligniteti kostne srži (30,5%), a potom tumori genitalnog (21,7%) i nervnog sistema (19,6%). Najređe je bio zahvaćen endokrini sistem (2,2%), potom limfatično tkivo i organi kao i digestivni sistem sa po 4,3% i urinarni i lokomotorni sistem sa po 8,7%.

Statističkom analizom podataka o lokalizaciji tumora u ispitivanoj grupi nađena je vrlo visoko statistički značajna razlika ( $\chi^2=26,696$ ;  $p<0,01$ ).

Posmatrajući razvojnu histogenezu maligniteta (tabela 1), tj. embrionalno poreklo maligniteta u ispitivanoj populaciji dece, utvrđeno je da je najveći broj maligniteta ispitanika (58,7%) mezodermalnog porekla, zatim su sledili maligniteti ektodermalnog (26,1%) i endodermalnog (10,9%) porekla dok su najređe bili zastupljeni maligniteti mešovitog embrionalnog porekla (4,3%).

Statističkom analizom podata o embrionalnom poreklu maligniteta u ispitivanoj grupi nađena je vrlo visoko statistički značajna razlika ( $\chi^2=32,435$ ;  $p<0,01$ ).

---

---

Analizirana je i distribucija normalnih i povišenih vrednosti odredivanih poznatih tumorskih markera u ispitivanoj grupi (tabela 1). Kako se u tabeli može videti, povišene vrednosti AFP zabeležene su kod 50% od 12 (26,1%) ispitanika kojima je ovaj marker urađen. Beta HCG je urađen kod 6 (13%) ispitanika a povišene vrednosti su zabeležene kod 16,7%. Kod 16 (34,8%) ispitanika određen je VMA i HVA u urinu, a povišene vrednosti su zabeležene kod 37,5% ispitanika.

Statističkom obradom podataka nije nađena statistički značajna razlika distribucije normalnih i povišenih vrednosti ni za jedan od analiziranih tumorskih markera ( $p > 0,05$ ).

Tabela 2. Uzrast u vreme postavljanja dijagnoze u zavisnosti od pola

Pol		Uzrast u vreme postavljanja Dg (godine)						Ukupno
		0 – 1	2 – 3	4 – 6	7 – 9	10 – 12	13 – 18	
Muški	N	2	7		5	5	6	25
	%	8	28		20	20	24	54,3
Ženski	N	3	5	2		3	8	21
	%	14,3	23,8	9,5		14,3	38,1	45,7
Ukupno	N	5	12	2	5	8	14	46
	%	10,9	26,1	4,3	10,9	17,4	30,4	100

Analizom distribucije starosnih grupa ispitanika zavisno od pola (tabela 2), može se videti da su najzastupljeni bili ispitanici uzrasta 13 – 18 godina (30,4%) a potom uzrasta 2 – 3 godine (26,1%). U populaciji dečaka, najzastupljenija je bila grupa ispitanika uzrasta 2 – 3 godine (28%) a zatim grupa uzrasta 13 – 18 godina (24%). U populaciji devojčica situacija je bila obrnuta, tj. najzastupljenija je bila grupa ispitanika uzrasta 13 – 18 godina (38,1%) a zatim je sledila grupa ispitanika uzrasta 2 – 3 godine (23,8%).

Statističkom analizom podataka prikazanih u tabeli 2, nađena je statistički značajna razlika u distribuciji starosnih grupa ( $\chi^2=13,739$ ;  $p<0,05$ ). Međutim, muški i ženski pol se nije statistički značajno razlikovao u distribuciji starosnih grupa ( $\chi^2=8,032$ ;  $p>0,05$ ).

Tabela 3. Embrionalno poreklo maligniteta u zavisnosti od pola

Pol		Embrionalno poreklo maligniteta				Ukupno
		Ektoderm	Mezoderm	Endoderm	Mešovito	
Muški	N	6	17	2	0	25
	%	24	68	8	0	54,3
Ženski	N	6	10	3	2	21
	%	28,6	47,6	14,3	9,5	45,7
Ukupno	N	12	27	5	2	46
	%	26,1	58,7	10,9	4,3	100

Tabela 3 prikazuje distribuciju embrionalnog poreka maligniteta u odnosu na pol ispitanika. Kako se u tabeli može videti, maligniteti mezodermalnog porekla su bili zastupljeniji kod ispitanika muškog pola (68%) nego kod ispitanika ženskog pola (47,6%). Ektodermalni maligniteti su bili približno podjednako zastupljeni kod ispitanika muškog (24%) i ženskog (28,6%) pola. Endodermalni maligniteti su bili zastupljeniji kod ženskog nego kod muškog pola (14,3% vs. 8%). Maligniteti mešovitog embrionalnog porekla nisu bili zabeleženi kod ispitanika muškog pola, dok su kod devojčica zabeleženi kod 9,5% ispitanika.

Statističkom analizom podataka prikazanih u tabeli 3, nije nađena statistički značajna razlika u embrionalnom poreklu maligniteta zavisno od pola ( $\chi^2=3,695$ ;  $p>0,05$ ).

Tabela 4. Embrionalno poreklo maligniteta u zavisnosti od uzrasta

Embrionalno poreklo		Uzrast u vreme postavljanja Dg (godine)						Ukupno
		0 – 1	2 – 3	4 – 6	7 – 9	10 – 12	13 – 18	
Ektoderm	N	3	4	0	2	1	2	12
	%	25	33,3	0	16,7	8,3	16,7	26,1
Mezoderm	N	0	7	2	3	7	8	27
	%	0	25,9	7,4	11,1	25,9	29,6	58,7
Endoderm	N	2	1	0	0	0	2	5
	%	40	20	0	0	0	40	10,9
Mešovito	N	0	0	0	0	0	2	2
	%	0	0	0	0	0	100	4,3
Ukupno	N	5	12	2	5	8	14	46
	%	10,9	26,1	4,3	10,9	17,4	30,4	100

Tabela 4 prikazuje distribuciju starosnih grupa ispitanika prema embrionalnom poreklu maligniteta. Kako se u tabeli može videti, ektodermalni maligniteti bili su najzastupljeni u uzrastu od 2 do 3 godine (33,3%). Mezodermalni maligniteti su bili najzastupljeniji u uzrastu od 13 do 18 godina (29,6%) dok je kod endodermalnih maligniteta najmlađa i najstarija starosna grupa bila zastupljena sa po 40%. Kod mešovitih maligniteta svi ispitanici su bili uzrasta od 13 do 18 godina (100%).

Statističkom analizom podataka prikazanih u tabeli 3, nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji starosnih grupa ( $\chi^2=19,633$ ;  $p>0,05$ ).

Ispitanici sa malignitetima mešovitog porekla bili su najstariji u vreme postavljanja dijagnoze sa srednjom vrednosti  $168,5 \pm 31,8$  meseci, zatim su sledili ispitanici sa malignitetima mezodermalnog ( $103,0 \pm 62,3$  meseca) i endodermalnog porekla ( $89,2 \pm 103,6$  meseci), dok su najmlađi bili ispitanici sa malignitetima ektodermalnog porekla ( $57,3 \pm 58,9$  meseci).

---

---

Maligniteti različitog embrionalnog porekla ne pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na uzrast ispitanika (  $F=2,254$ ;  $p>0,05$ ).

Tabela 5. Vrsta maligniteta u zavisnosti od pola

Pol		Vrsta maligniteta		Ukupno
		Solidni	Limfoproliferativni i plazmaćelijski	
Muški	N	13	12	25
	%	52	48	54,3
Ženski	N	16	5	21
	%	76,2	23,8	45,7
Ukupno	N	29	17	46
	%	63	37	100

Tabela 5 prikazuje distribuciju vrste maligniteta prema polu ispitanika. Kako se u tabeli može videti, solidni tumori su bili češće zastupljeni kako kod ispitanika ženskog (76,2%) tako i kod ispitanika muškog pola (52%).

Statističkom analizom podataka prikazanih u tabeli 5, nije nađena statistički značajna razlika u vrsti tumora zavisno od pola ( $\chi^2=2,867$ ;  $p>0,05$ ).



Tabela 6. Lokalizacija tumora u zavisnosti od pola

Pol		Lokalizacija tumora								Ukupno
		Urinarni sistem	Genitalni sistem	Nervni sistem	Lokomotorni sistem	Endokrini sistem	Limfatično tkivo i organi	Kostna srž	Digestivni sistem	
Muški	N	2	3	3	3	1	2	10	1	25
	%	8	12	12	12	4	8	40	4	54,3
Ženski	N	2	7	6	1	0	0	4	1	21
	%	9,5	33,3	28,6	4,8	0	0	19	4,8	45,7
Ukupno	N	4	10	9	4	1	2	14	2	46
	%	8,7	21,7	19,6	8,7	2,2	4,3	30,4	4,3	100

Tabela 6 prikazuje distribuciju lokalizacije tumora prema polu ispitanika. Kako se u tabeli može videti, muški ispitanici su najčešće imali malignitet kostne srži (40%), dok je kod ženskih ispitanika to bio genitalni sistem (33,3%) a zatim je sledio nervni sistem (28,6%).

Ispitanici muškog i ženskog pola se nisu statistički značajno razlikovali u distribuciji lokalizacije tumora ( $\chi^2=8,891$ ;  $p>0,05$ ). Međutim, kod ispitanika muškog pola visoko statistički značajno najčešća lokalizacija je bila u kostnoj srži ( $\chi^2=18,840$ ;  $p<0,01$ ), dok kod ženskog pola nije nađena statistički značajna razlika distribucije lokalizacije tumora ( $\chi^2=9,571$ ;  $p>0,05$ ).

Nađena je statistički značajna korelacijska povezanost lokalizacije tumora i pola ( $r=-0,293$ ;  $p<0,05$ ).

Tabela 7. Lokalizacija tumora u zavisnosti od uzrasta

Lokalizacija tumora		Uzrastne grupe u vreme postavljenja Dg (godine)						Ukupno
		0 – 1	2 – 3	4 – 6	7 – 9	10 – 12	13 – 18	
Urinarni sistem	N		3	1				4
	%		75	25				8,7
Genitalni sistem	N	1	2	1			6	10
	%	10	20	10			60	21,7
Nervni sistem	N	2	4			1	2	9
	%	22,2	44,4			11,1	22,2	19,6
Lokomotorni sistem	N				1	2	1	4
	%				25	50	25	8,7
Endokrini sistem	N				1			1
	%				100			2,2
Limfatično tkivo i organi	N						2	2
	%						100	4,3
Kostna srž	N		3		3	5	3	14
	%		21,4		21,4	35,7	21,4	30,4
Digestivni sistem	N	2						2
	%	100						4,3
Ukupno	N	5	12	2	5	8	14	46
	%	10,9	26,1	4,3	10,9	17,4	30,4	100,0

Tabela 7 prikazuje distribuciju lokalizacije tumora u zavisnosti od uzrasta ispitanika. Kako se u tabeli može videti, 75% tumora lokalizovanih na urinarnom sistemu javilo se kod ispitanika uzrasta 2 – 3 godine. Tumori genitalnog sistema su bili najčešći u uzrastu 13 – 18 godina (60%). Tumori nervnog sistema bili su najzastupljeniji u uzrastu 2 – 3 godine (44,4%) dok su tumori lokomotornog sistema (50%) i maligniteti kostne srži bili najzastupljeniji u uzrastu 10 – 12 godina. Svi tumori (100%) endokrinog sistema zabeleženi su u uzrastu 7 – 9 godina, tumori

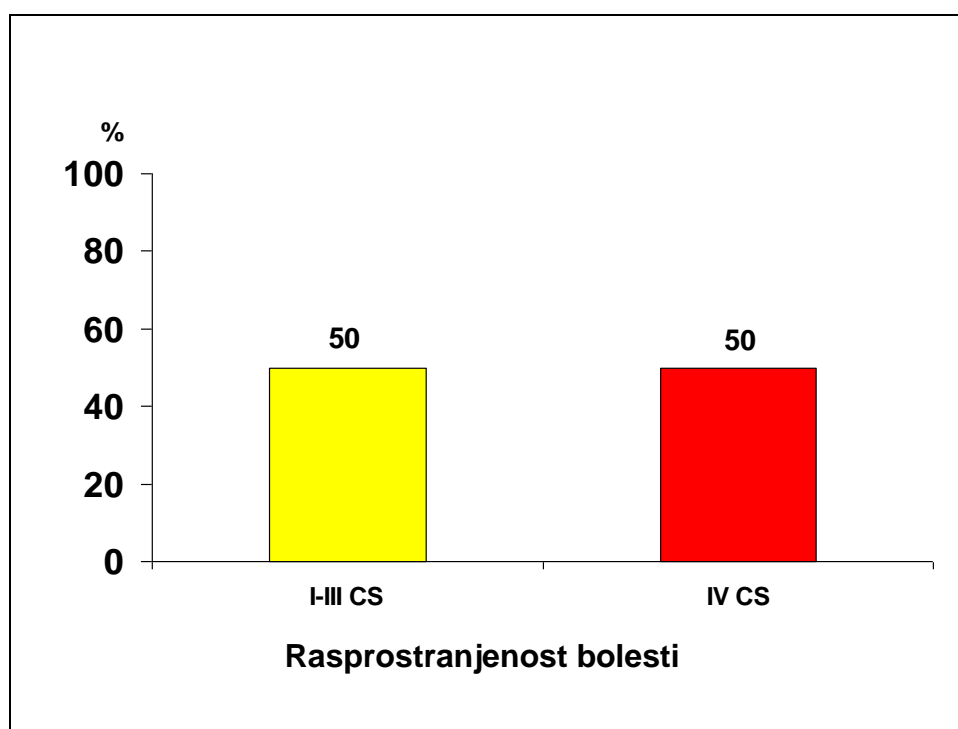
---

---

limfatičnog tkiva i organa u uzrastu 13 – 18 godina. Tumori koji su zahvatili digestivni sistem javili su se u dojenačkom uzrastu (do 1 godine).

Statistička analiza podataka prikazanih u tabeli 7 pokazuje visoko statistički značajnu razliku lokalizacije tumora zavisno od uzrasta ispitanika ( $\chi^2=61,761$ ;  $p<0,01$ ).

Grafikon 1. Rasprostranjenost bolesti



Grafikon 1 prikazuje distribuciju rasprostranjenosti bolesti u ispitivanoj grupi.

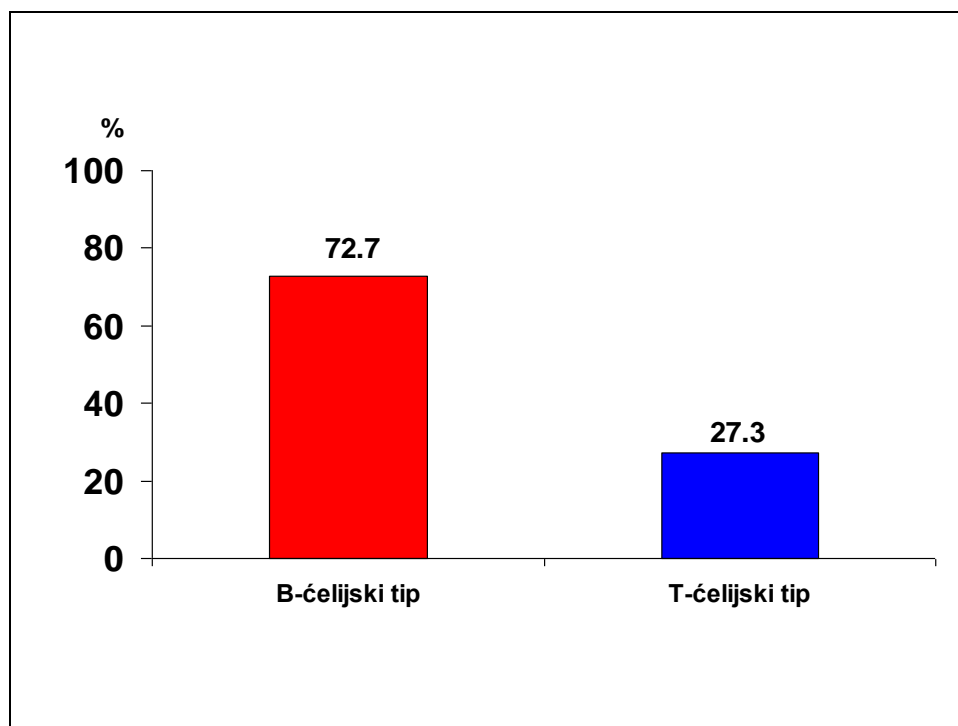
Kako se iz grafikona može videti, polovina ispitanika (50%) je bila od I do III kliničkog stadijuma bolesti, a toliko ih je bilo i u IV stadijumu (50%).

Statističkom analizom podataka o rasprostranjenosti bolesti u ispitivanoj grupi nije nađena statistički značajna razlika ( $\chi^2=0,000$ ;  $p>0,05$ ).

---

---

Grafikon 2. Zastupljenost B i T ćelijskih maligniteta kod ALL i NHL



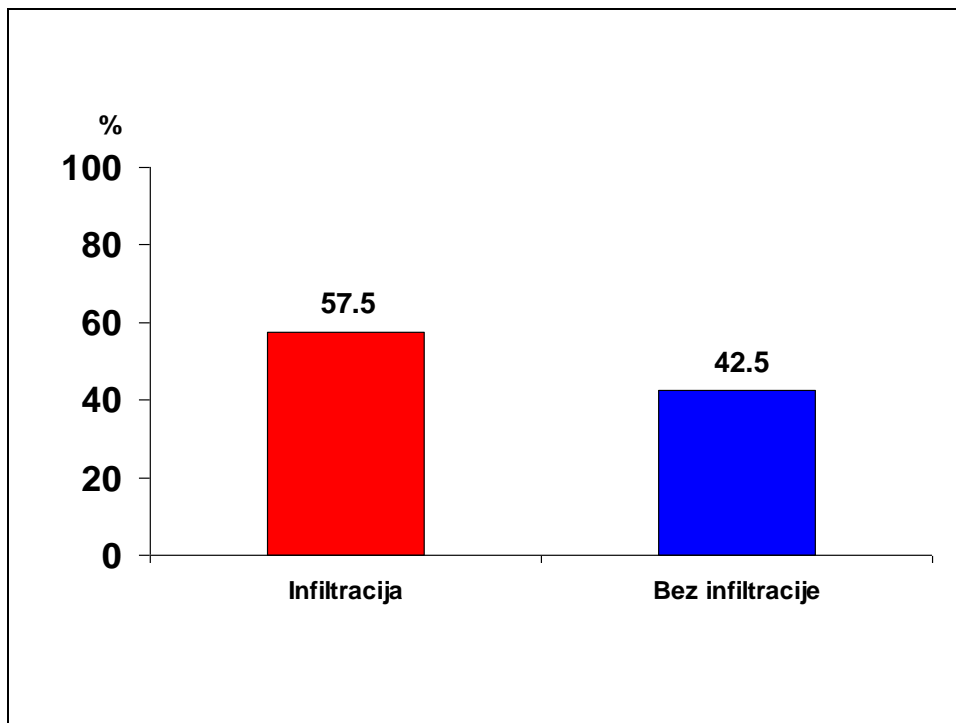
Grafikon 2 prikazuje distribuciju B i T ćelijskih maligniteta kod obolelih od ALL i NHL u ispitivanoj grupi. Od ukupnog broja ispitanika (46), ovu vrstu maligniteta imalo je 11 (23,9%) ispitanika. Kako se iz grafikona može videti, B-ćelijski tip je imalo 72,7% ispitanika dok je sa T-ćelijskim tipom bilo 27,3% ispitanika.

Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 2 nije nađena statistički značajna razlika ( $\chi^2=2,273$ ;  $p>0,05$ ).

---

---

Grafikon 3. Aspiracija kostne srži



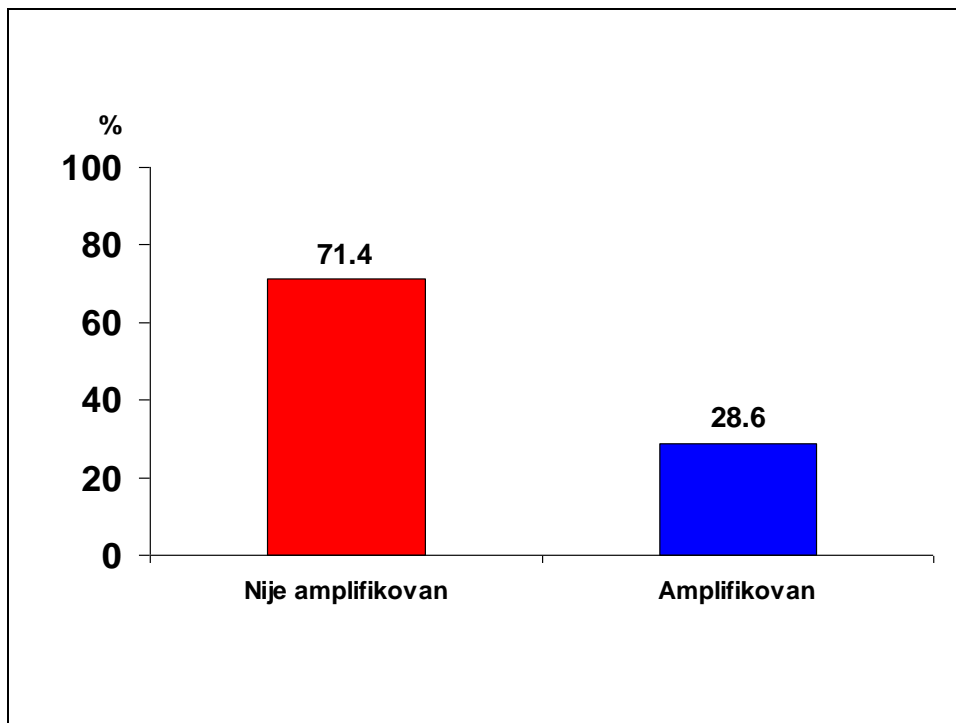
Grafikon 3 prikazuje distribuciju infiltracije kostne srži u ispitivanoj grupi. Od ukupnog broja ispitanika (46) aspiracija kostne srži urađena je kod 40 (87%) ispitanika. Kako se iz grafikona može videti, kod 57,5% ispitanika nađena je infiltracija kostne srži dok kod 42,5% ispitanika nije bilo infiltracije kostne srži.

Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 3 nije nađena statistički značajna razlika ( $\chi^2=0,900$ ;  $p>0,05$ ).

---

---

Grafikon 4. Prisustvo N-myc amplifikacije kod neuroblastoma



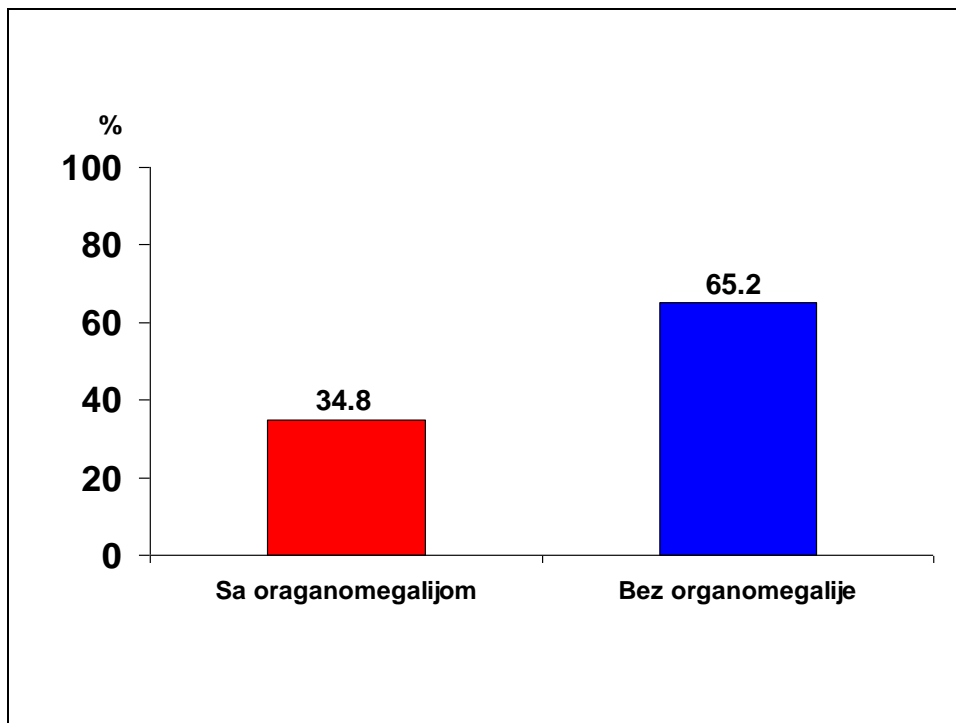
Grafikon 4 prikazuje distribuciju prisustva N-myc amplifikacije u tumorskim ćelijama kod dece obolele od neuroblastoma u ispitivanoj grupi. Od ukupnog broja ispitanika (46), određivanje N-myc amplifikacije je sprovedeno kod 7 (15,2%) ispitanika. Kako se iz grafikona može videti, kod 28,6% ispitanika je postojala N-myc amplifikacija u tumorskim ćelijama, dok kod većine ispitanika (71,4%) N-myc amplifikacija nije bila prisutna u tumorskim ćelijama.

Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 4 nije nađena statistički značajna razlika ( $\chi^2=1,286$ ;  $p>0,05$ ).

---

---

Grafikon 5. Organomegalija

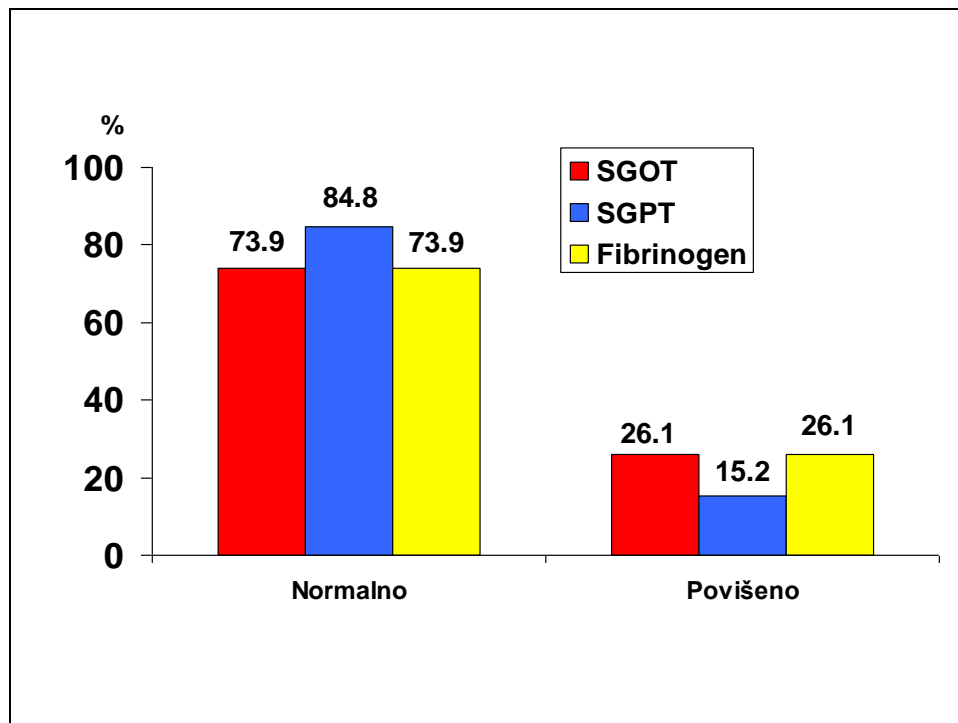


Na grafikonu 5 prikazana je učestalost pojave organomegalije (hepato i/ili splenomegalija) u ispitivanoj grupi. Kako se u grafikonu može videti, hepato i/ili splenomegalija je bila prisutna kod 34,8% ispitanika dok većina ispitanika (65,2%) nije imala organomegaliju.

Statističkom obradom podataka prikazanih u grafikonu 5 nađeno je statistički značajno više ispitanika bez organomegalije ( $\chi^2=4,261$ ;  $p<0,05$ ).

---

Grafikon 6. Transaminaze i fibrinogen



Na grafikonu 6 prikazana je distribucija normalnih i povišenih vrednosti transaminaza (SGOT i SGPT) kao i fibrinogena u ispitivanoj grupi. Kako se iz grafikona može videti, povišene vrednosti SGOT zabeležene su kod 26,1% ispitanika što je bio slučaj i sa povišenim vrednostima fibrinogena koje su takođe zabeležene kod 26,1% ispitanika. Povišene vrednosti SGPT su zabeležene kod 15,2% ispitanika. Najveći broj ispitanika, kada je reč o sva tri posmatrana parametra, imalo je normalne vrednosti navedenih parametara.

Statističkom obradom podataka prikazanih na grafikonu 6 nađen je visoko statistički značajno veći broj ispitanika sa normalnim vrednostima SGOT ( $\chi^2=10,552$ ;  $p<0,01$ ) što je bio slučaj i sa vrednostima SGPT ( $\chi^2=22,261$ ;  $p<0,01$ ) i fibrinogena ( $\chi^2=10,552$ ;  $p<0,01$ ).

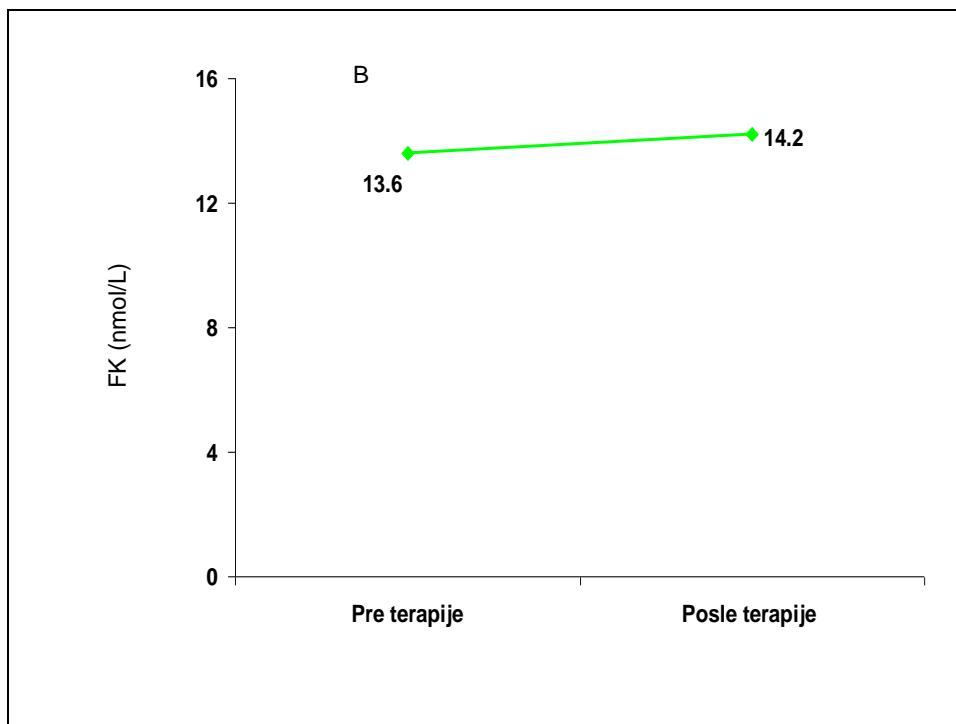
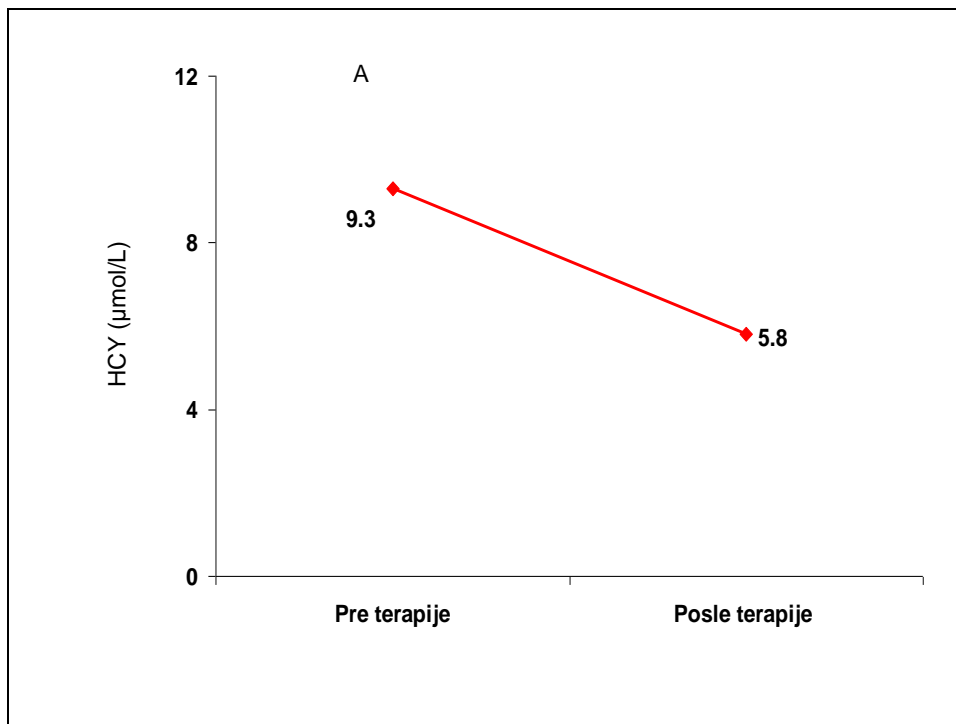


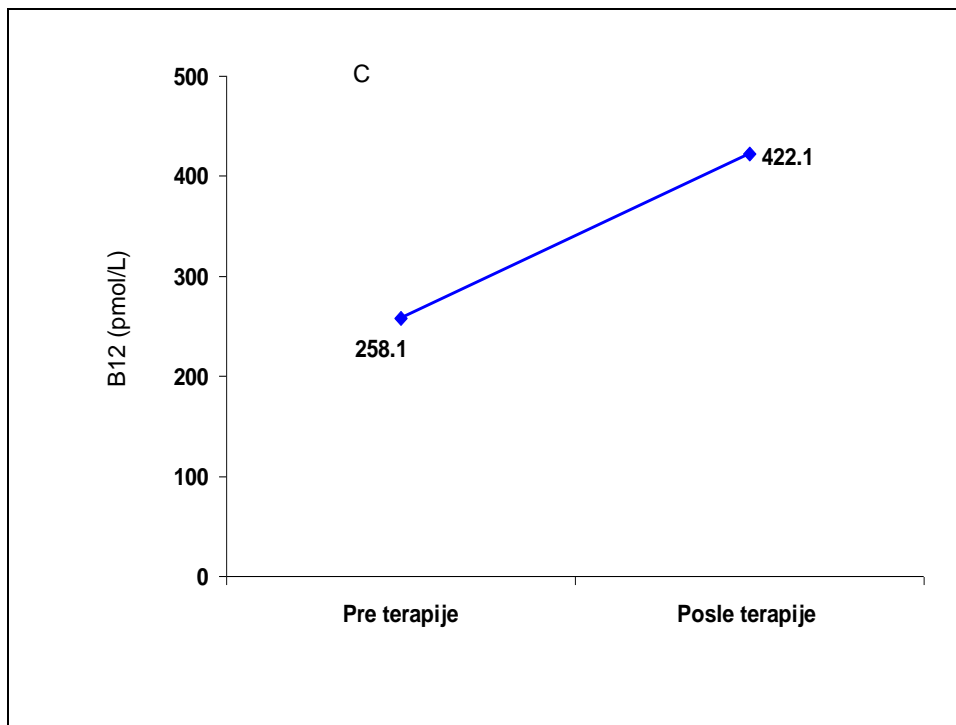
---

---

## 4.2. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od terapijskog modaliteta

Grafikon 7. HCY (A), FK (B) i B12 (C) pre i posle celokupne terapije





Grafikon 7 prikazuje promene srednjih vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> pre primene bilo koje terapije i nakon završetka terapijskog tretmana. Kako se iz grafikona može videti, HCY pokazuje pad vrednosti nakon završetka terapijskog protokola ( $5,8 \pm 3,3 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na vrednosti pre primene bilo koje terapije ( $9,3 \pm 6,8 \mu\text{mol/L}$ ). Trend porasta srednje vrednosti pokazuje vitamin B<sub>12</sub> čija je srednja vrednost pre primene terapije bila  $258,1 \pm 165,9 \text{ pmol/L}$ , a nakon završetka terapijskog protokola  $422,1 \pm 320,6 \text{ pmol/L}$ . Trend porasta srednje vrednosti pokazuje i FK čija je srednja vrednost pre primene terapije bila  $13,6 \pm 10,8 \text{ nmol/L}$ , a nakon završetka terapijskog protokola  $14,2 \pm 8,2 \text{ nmol/L}$ .

Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 7 nađen je visoko statistički značajan pad vrednosti HCY nakon završetka terapijskog protokola ( $t=2,556$ ;  $p<0,01$ ) kao i statistički značajan porast vrednosti B<sub>12</sub> nakon završetka terapijskog protokola ( $t= -2,325$ ;  $p<0,05$ ). Srednje vrednosti FK ne pokazuju statistički značajnu promenu pre i nakon terapijskog protokola ( $t= -0,256$ ;  $p>0,05$ )

---

---

Nađena je statistički značajna korelacijska povezanost vrednosti FK pre započinjanja terapije i vrednosti AFP ( $r=0,693$ ;  $p<0,05$ ). Ova povezanost suštinski znači, da kod ispitanika sa višim vrednostima AFP očekujemo i više vrednosti folne kiseline. Takođe, vrednosti B12 pre započinjanja terapije pokazuju statistički značajnu korelacijsku povezanost sa pozitivnošću VMA i HVA u urinu ( $r= - 0,693$ ;  $p<0,05$ ) što suštinski znači da kod ispitanika sa pozitivnim VMA i HVA u urinu možemo očekivati niže vrednosti B12 pre započinjanja terapije. Vrednosti SGOT ( $r=0,338$ ;  $p<0,05$ ) i vrednosti SGPT ( $r=0,442$ ;  $p<0,05$ ) pokazuju statistički značajnu korelacijsku povezanost sa vrednostima B12 pre terapije. Vrednosti SGOT pokazuju statistički značajnu korelacijsku povezanost sa vrednostima FK na kraju celokupne terapije ( $r=0,414$ ;  $p<0,05$ ).

Posmatrajući vrednosti HCY, FK i B12 zavisno od njihovih referentnih vrednosti za dati uzrast, izvršili smo klasifikaciju ispitanika sa smanjenim, normalnim i povišenim vrednostima, prethodno praćenih pomenutih parametara. Dalje, zanimalo nas je da li su se i kako navedeni parametri promenili nakon završetka terapije, tačnije koliko je ispitanika sa smanjenjem vrednosti parametara prešlo iz opsega povišenih u normalne ili smanjene vrednosti ili pak iz opsega normalnih u smanjene vrednosti što smo klasifikovali kao *smanjenje*. Odnosno, koliko je ispitanika sa povećanjem vrednosti parametara prešlo iz opsega smanjenih vrednosti u normalne ili povišene odnosno iz normalnih u povišene što smo klasifikovali kao *povećanje*. Ispitanike kod kojih nije bilo promene vrednosti parametara iz jednog u drugi opseg vrednosti označili smo *bez promene*.

Tabela 8. Promene HCY, FK i B12 pre i nakon terapije

Parametar	Smanjenje (%)	Povećanje (%)	Bez promene (%)	$\chi^2$	P
HCY	52	16	32	-2,427	<0,05
FK	4	12	84	-1,000	>0,05
B12	20	24	56	-0,535	>0,05

Kako je prikazano u tabeli 8, najveći broj ispitanika, nakon terapije, imao je smanjenje tj. prešao je u niži opseg vrednosti HCY (52%) u odnosu na vrednosti pre terapije. Međutim, vrednosti FK kod najvećeg broja ispitanika (84%) ostale su u istom opsegu kao i pre terapije što je bio slučaj i sa vrednostima B12 gde je 56% ispitanika ostalo u istom opsegu vrednosti u kome su bili i pre terapije.

S druge strane, posmatrali smo promene nominalnih vrednosti HCY, FK i B12 nezavisno od opsega referentnih vrednosti. Tačnije, da li je nakon terapije došlo do bilo kakve promene nominalnih vrednosti parametara u smislu smanjenja ili povećanja.

---

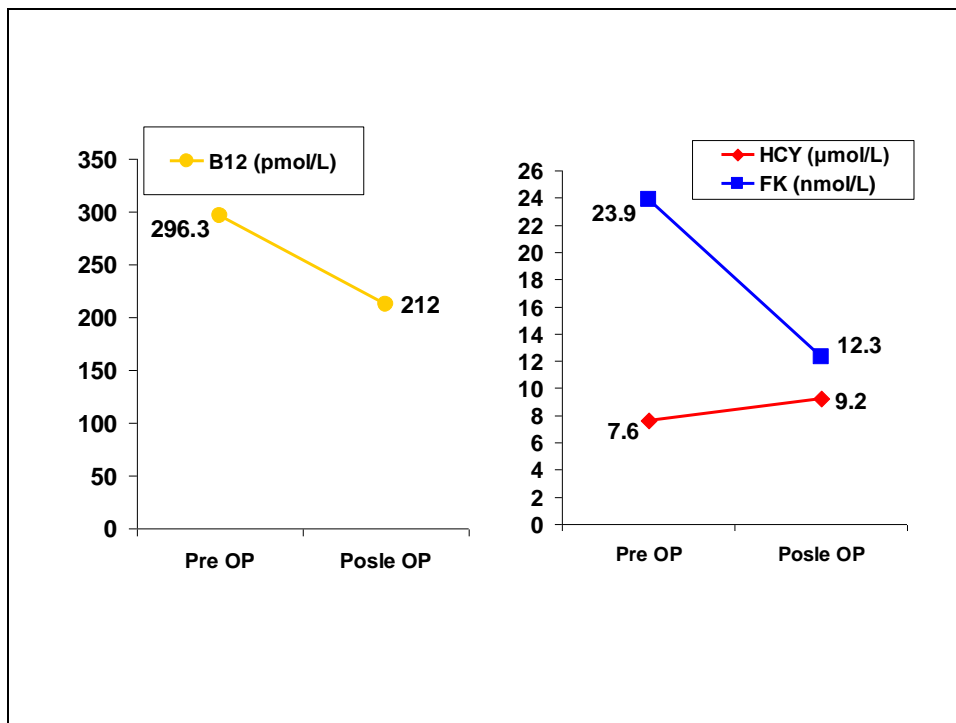
---

Tabela 9. Promene nominalnih vrednosti HCY, FK i B12 pre i nakon terapije

Parametar	Smanjenje (%)	Povećanje (%)	$\chi^2$	P
HCY	68	32	-2,286	<0,05
FK	48	52	-0,390	>0,05
B12	40	60	-1,735	>0,05

U tabeli 9 prikazana je distribucija promena nominalnih vrednosti HCY, FK i B12 nakon primene celokupne terapije u odnosu na vrednosti pre bilo koje terapije. Kako se u tabeli može videti, najveći broj ispitanika je imao smanjenje nominalnih vrednosti HCY nakon terapije (68%). Za razliku od HCY, najveći broj ispitanika imao je povećanje nominalnih vrednosti FK (52%) kao i B12 (60%) nakon primene terapije.

Grafikon 8. HCY, FK i B12 pre i posle operativnog lečenja



Grafikon 8 prikazuje promene srednjih vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> pre i nakon operativnog lečenja (OP). Kako se iz grafikona može videti, HCY pokazuje porast srednje vrednosti nakon OP ( $9,2 \pm 4,8 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na vrednost pre OP ( $7,6 \pm 7,8 \text{ nmol/L}$ ). Trend pada srednjih vrednosti nakon operativnog lečenja pokazuju vrednosti vitamina B<sub>12</sub> čija je srednja vrednost pre OP bila  $296,3 \pm 170,2 \mu\text{mol/L}$  a nakon OP  $212,1 \pm 120,6 \text{ pmol/L}$ , kao i srednja vrednost FK koja je pre OP bila  $23,9 \pm 14,9 \text{ nmol/L}$  a nakon OP  $12,3 \pm 6,4 \text{ pmol/L}$ .

Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 8 nađen je statistički značajan pad srednje vrednosti FK nakon OP ( $t=2,811$ ;  $p<0,05$ ) kao i srednje vrednosti B12 ( $t= 3,701$ ;  $p<0,05$ ). Srednje vrednosti HCY ne pokazuju statistički značajnu promenu pre i nakon OP ( $t=-0,950$ ;  $p>0,05$ ).

Analiza promena HCY, FK i B12 pre i nakon OP, urađena po istom principu kao i u prethodnom slučaju, prikazana je u tabelama 10 i 11.

Tabela 10. Promene HCY, FK i B12 pre i nakon OP

Parametar	Smanjenje (%)	Povećanje (%)	Bez promene (%)	$\chi^2$	P
HCY	14,3	57,2	28,6	-1,414	>0,05
FK	28,6	0	62,4	-1,414	>0,05
B12	57,2	0	42,3	-2,000	<0,05

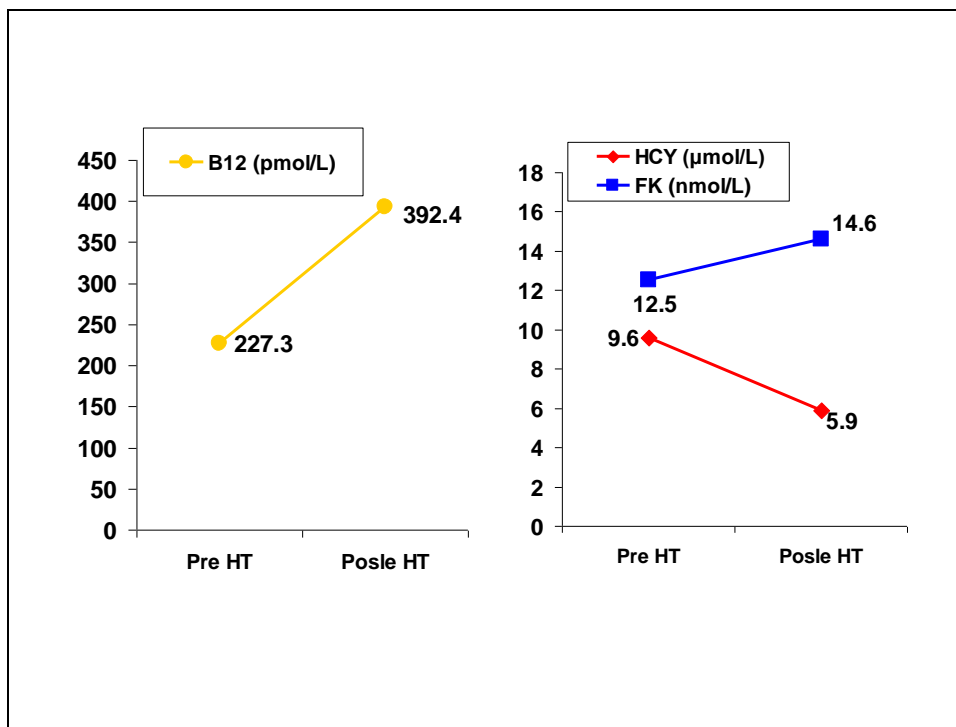
Kako je prikazano u tabeli 10, najveći broj ispitanika je nakon OP imao povećanje tj. prešao je u viši opseg vrednosti HCY (57,2%) u odnosu na vrednosti pre OP. Međutim, vrednosti FK kod najvećeg broja ispitanika (62,4%) ostale su u istom opsegu kao i pre OP dok je vrednost B12 kod najvećeg broja ispitanika prešla u niži opseg u odnosu na vrednosti pre OP (57,2%).

Tabela 11. Promene nominalnih vrednosti HCY, FK i B12 pre i nakon OP

Parametar	Smanjenje (%)	Povećanje (%)	$\chi^2$	P
HCY	28,6	62,4	-1,014	>0,05
FK	100	0	-2,336	<0,05
B12	100	0	-2,336	<0,05

U tabeli 11 prikazana je distribucija promena nominalnih vrednosti HCY, FK i B12 nakon OP u odnosu na vrednosti pre OP. Kako se u tabeli može videti, kod svih ispitanika (100%) došlo je do smanjenja vrednosti FK nakon operativnog lečenja što je bio slučaj i sa nominalnim vrednostima B12. Kod najvećeg broja ispitanika (62,4%) zabeležen je porast vrednosti HCY nakon OP.

Grafikon 9. HCY, FK i B12 pre i posle hemioterapije



Grafikon 9 prikazuje promene srednjih vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> pre i nakon primene hemioterapije (HT). Kako se iz grafikona može videti, HCY pokazuje pad srednje vrednosti nakon HT ( $5,9 \pm 3,5$  µmol/L) u odnosu na vrednost pre HT ( $9,6 \pm 6,1$  nmol/L). Trend porasta srednjih vrednosti nakon HT pokazuju vrednosti vitamina B<sub>12</sub> čija je srednja vrednost pre HT bila  $227,3 \pm 145,8$  nmol/L a nakon HT  $392,4 \pm 309$  nmol/L, kao i srednja vrednost FK koja je pre HT bila  $12,5 \pm 8,8$  pmol/L a nakon HT  $14,6 \pm 8,3$  pmol/L.

Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 9 nađen je visoko statistički značajan pad srednje vrednosti HCY nakon HT ( $t=3,375$ ;  $p<0,01$ ). Takođe, statistički značajan porast srednjih vrednosti nakon HT zabeležen je kod B<sub>12</sub> ( $t=-2,593$ ;  $p<0,05$ ). Srednje vrednosti FK ne pokazuju statistički značajnu promenu pre i nakon HT ( $t=-1,026$ ;  $p>0,05$ ).



---

---

Analiza promena HCY, FK i B12 pre i nakon HT, urađena po istom principu kao i u prethodna dva slučaja, prikazana je u tabelama 12 i 13.

Tabela 12. Promene HCY, FK i B12 pre i nakon HT

Parametar	Smanjenje (%)	Povećanje (%)	Bez promene (%)	$\chi^2$	P
HCY	52	8	40	-2,829	<0,01
FK	3,8	23,1	73,1	-1,933	>0,05
B12	7,6	42,3	50	-2,500	<0,05

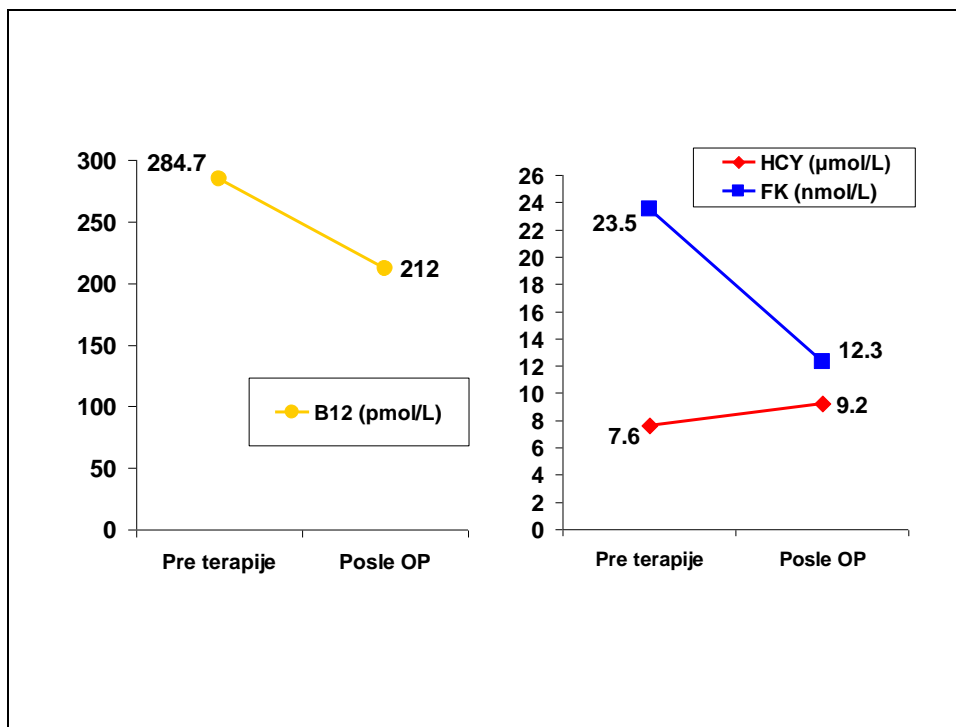
Kako je prikazano u tabeli 12, najveći broj ispitanika je nakon HT imao smanjenje tj. prešao je u niži opseg vrednosti HCY (52%) u odnosu na vrednosti pre HT. Vrednosti FK kod najvećeg broja ispitanika (73,1%) ostale su u istom opsegu kao i pre HT što je bio slučaj i sa vrednostima B12 kod koga je takođe najveći broj ispitanika ostao u istom opsegu sa vrednostima pre HT (50%).

Tabela 13. Promene nominalnih vrednosti HCY, FK i B12 pre i nakon HT

Parametar	Smanjenje (%)	Povećanje (%)	$\chi^2$	P
HCY	80,8	19,2	-3,467	<0,01
FK	42,3	57,7	-1,235	>0,05
B12	19,2	80,8	-2,857	<0,01

U tabeli 13 prikazana je distribucija promena nominalnih vrednosti HCY, FK i B12 nakon HT u odnosu na vrednosti pre HT. Kako se u tabeli može videti, kod najvećeg broja ispitanika (80,8%) došlo je do smanjena vrednosti HCY nakon HT. Kod najvećeg broja ispitanika (57,7%) zabeležen je porast vrednosti FK nakon HT što je bio slučaj i kod vrednosti B12 gde je takođe najveći broj ispitanika (80,8%) imao povećanje vrednosti nakon HT.

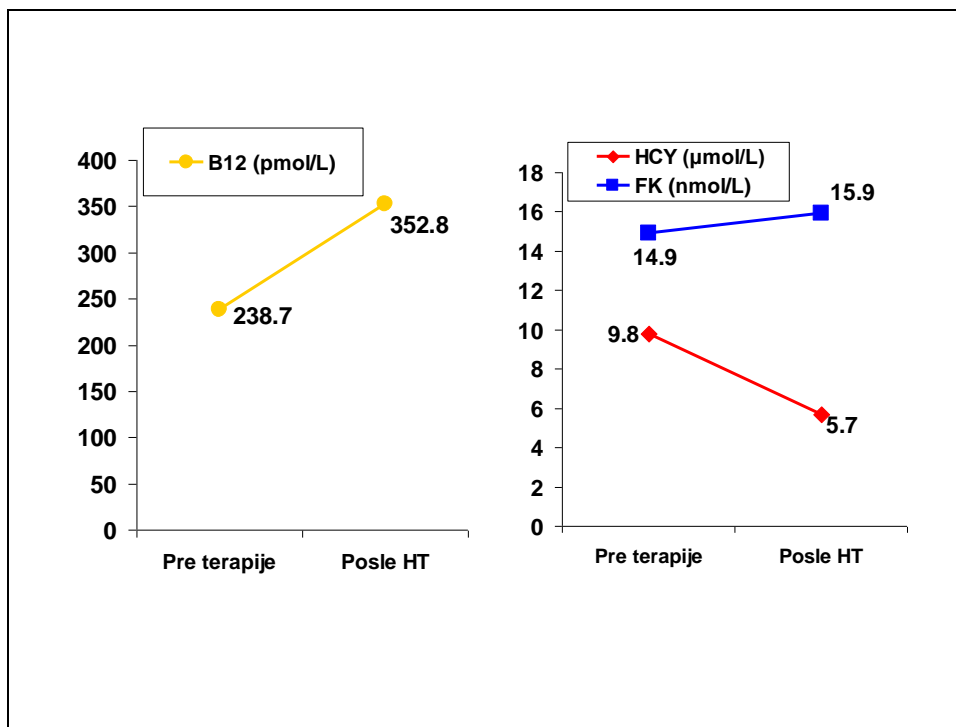
Grafikon 10. HCY, FK i B12 pre započinjanja terapije i posle OP



Grafikon 10 prikazuje promene srednjih vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> pre započinjanja bilo kakve terapije i nakon OP. Kako se iz grafikona može videti, HCY pokazuje porast srednje vrednosti nakon OP ( $9,2 \pm 4,8$  µmol/L) u odnosu na vrednost pre započinjanja terapije ( $7,6 \pm 7,8$  µmol /L). Trend pada srednjih vrednosti nakon OP pokazuju vrednosti vitamina B<sub>12</sub> čija je srednja vrednost pre započinjanja terapije bila  $284,7 \pm 166,8$  nmol/L a nakon OP  $212 \pm 144,1$  nmol/L, kao i srednja vrednost FK koja je pre započinjanja terapije bila  $23,5 \pm 15,4$  pmol/L a nakon OP  $12,3 \pm 6,4$  pmol/L.

Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 10 nađen je visoko statistički značajan pad srednje vrednosti B12 nakon OP u odnosu na vrednost pre započinjanja terapije ( $t=6,077$ ;  $p<0,01$ ). Takođe, statistički značajan pad srednje vrednosti nakon OP zabeležen je kod FK ( $t=2,640$ ;  $p<0,05$ ). Srednje vrednosti HCY ne pokazuju statistički značajnu promenu srednjih vrednosti pre započinjanja terapije u odnosu srednju vrednost nakon OP ( $t=-0,972$ ;  $p>0,05$ ).

Grafikon 11. HCY, FK i B12 pre započinjanja terapije i posle HT



Grafikon 11 prikazuje promene srednjih vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> pre započinjanja bilo kakve terapije i nakon HT. Kako se iz grafikona može videti, HCY pokazuje pad srednje vrednosti nakon HT ( $5,7 \pm 3,5$  µmol/L) u odnosu na vrednost pre započinjanja terapije ( $9,8 \pm 7,7$  nmol/L). Trend porasta srednjih vrednosti nakon HT pokazuju vrednosti vitamina B<sub>12</sub> čija je srednja vrednost pre započinjanja terapije bila  $238,7 \pm 165,9$  nmol/L a nakon HT  $352,8 \pm 304,4$  nmol/L, kao i srednja vrednost FK koja je pre započinjanja terapije bila  $14,9 \pm 12$  pmol/L a nakon HT  $15,9 \pm 8,7$  pmol/L.

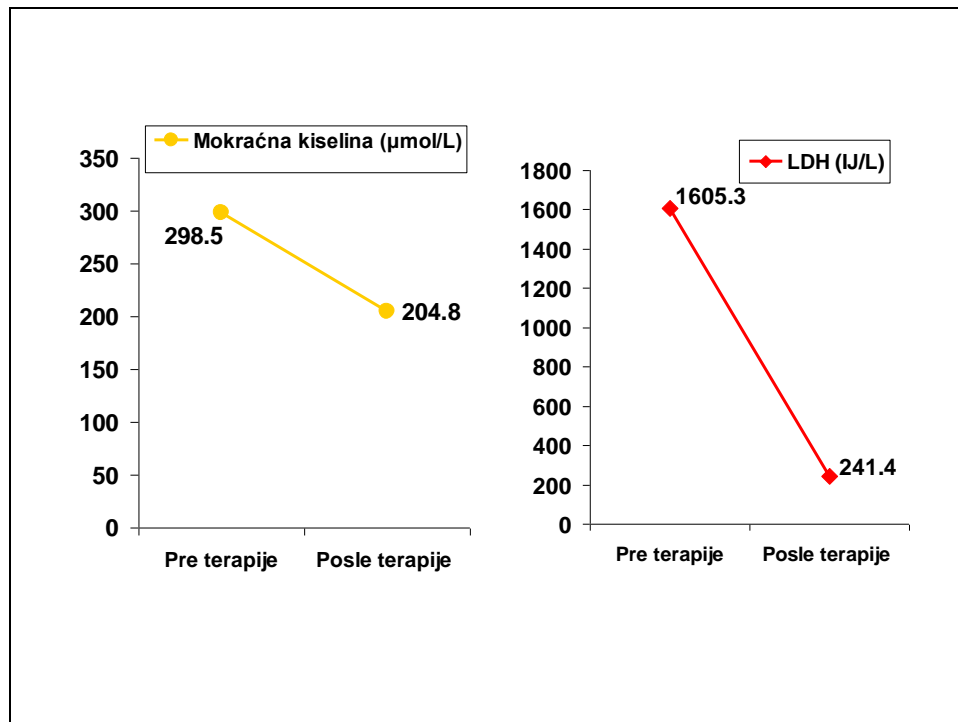
Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 11 nađen je statistički značajan pad srednje vrednosti HCY nakon HT u odnosu na vrednosti pre započinjanja terapije ( $t=2,450$ ;  $p<0,05$ ). Srednje vrednosti FK ne pokazuju statistički značajnu promenu pre započinjanja terapije u odnosu na srednju vrednost nakon HT ( $t=-0,390$ ;  $p>0,05$ ), što je bio slučaj i sa srednjim vrednostima B12 ( $t=-1,449$ ;  $p>0,05$ ).

---

---

### 4.3. Mokraćna kiselina i laktat dehidrogenaza u zavisnosti od terapijskog modaliteta

Grafikon 12. Mokraćna kiselina i LDH pre i posle celokupne terapije



Grafikon 12 prikazuje promene srednjih vrednosti MK i LDH pre primene terapije i nakon završetka terapijskog tretmana. Kako se iz grafikona može videti, MK pokazuje pad vrednosti nakon završetka terapijskog protokola ( $204,8 \pm 78,1$  μmol/L) u odnosu na vrednosti pre primene bilo koje terapije ( $298,5 \pm 197$  μmol /L). Isti trend pada, ali znatno izraženiji u odnosu na MK, pokazuje i promena vrednosti LDH čija je srednja vrednost pre primene terapije bila  $1605,3 \pm 314,8$  IJ/L a nakon završetka terapijskog protokola  $241,4 \pm 47,3$  IJ/L.

Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 12 nađen je statistički značajan pad vrednosti MK nakon završetka terapijskog protokola ( $t=2,499$ ;  $p<0,05$ ) kao i statistički značajan pad vrednosti LDH nakon završetka terapijskog protokola ( $t=2,705$ ;  $p<0,05$ ).

---

---

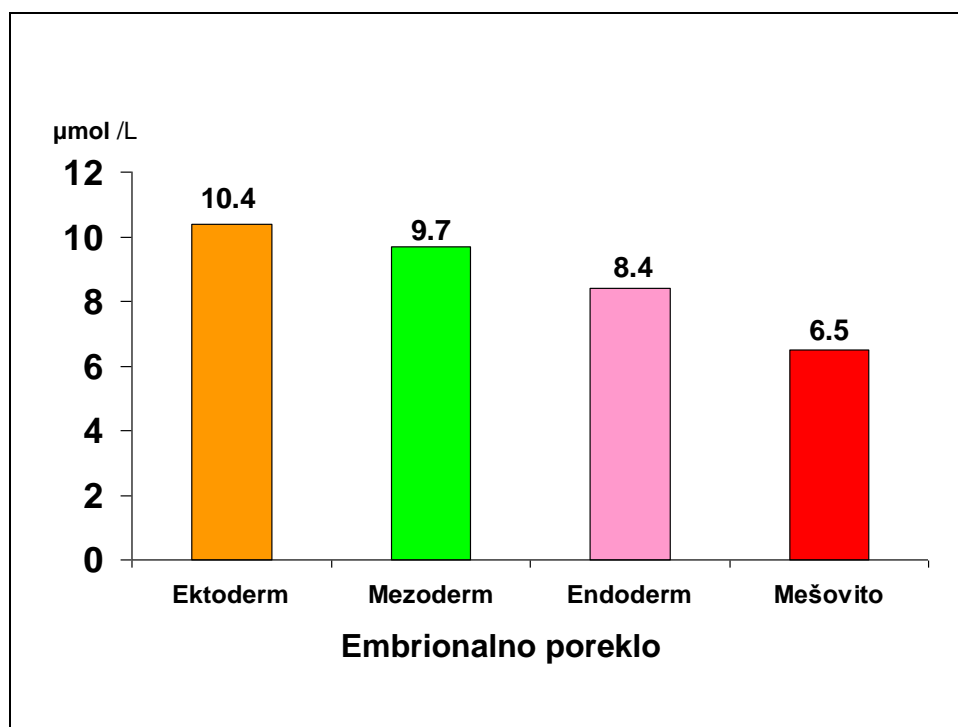
Vrednosti MK pokazuje visoko statistički značajnu korelacijsku povezanost sa vrednostima HCY pre terapije ( $r=0,446$ ;  $p<0.01$ ) što suštinski znači da se kod ispitanika sa višim vrednostima MK pre terapije, očekuju i više vrednosti HCY.

---

---

#### 4.4. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od embrionalnog porekla maligniteta

Grafikon 13. Vrednosti HCY u zavisnosti od embrionalnog porekla maligniteta

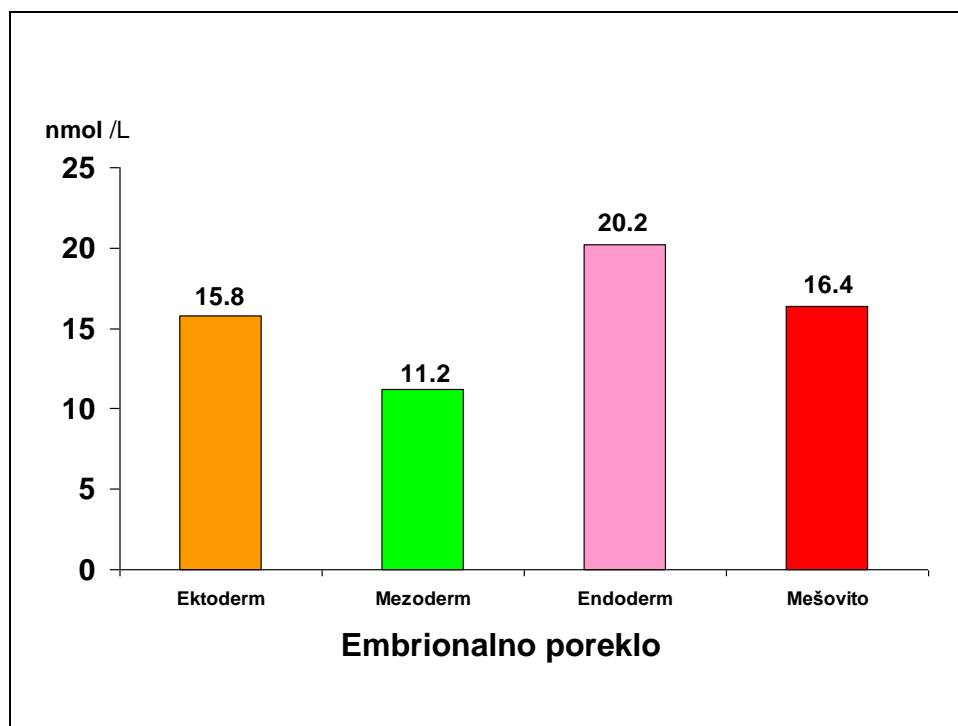


Na grafikonu 13 prikazane su srednje vrednosti HCY u zavisnosti od embrionalnog porekla maligne bolesti. Kako se na grafikonu može videti, najviše vrednosti HCY zabeležene su kod maligniteta ektodermalnog porekla ( $10,4 \pm 5,3$  µmol/L), zatim su sledili mezodermalni ( $9,7 \pm 6,9$  µmol/L) i ektodermalni ( $8,4 \pm 5,4$  µmol/L) maligniteti. Maligniteti mešovitog embrionalnog porekla imali su najnižu srednju vrednost HCY.

Srednje vrednosti HCY se nisu statistički značajno razlikovale između malignih bolesti različitog embrionalnog porekla ( $F=0,197$ ;  $p>0,05$ ).

---

Grafikon 14. Vrednosti FK u zavisnosti od embrionalnog porekla maligniteta



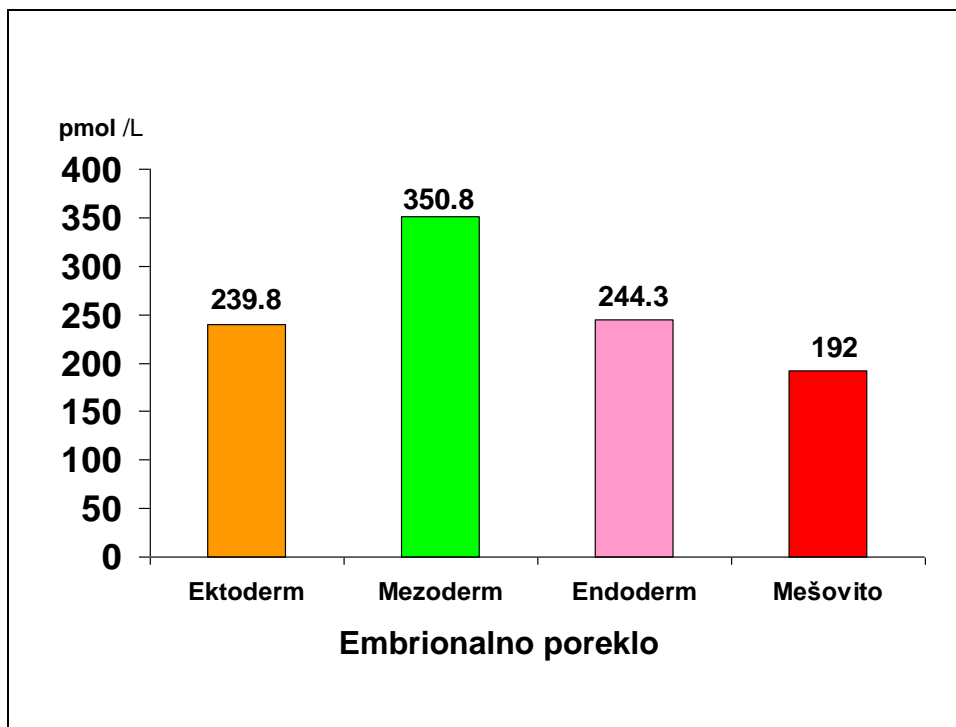
Na grafikonu 14 prikazane su srednje vrednosti FK u zavisnosti od embrionalnog porekla maligniteta. Kako se na grafikonu može videti, najviše vrednosti FK zabeležene su kod maligniteta endodermalnog porekla ( $20,2 \pm 17,8$  nmol/L), zatim su sledili maligniteti mešovitog ( $16,4$  nmol/L) i ektodermalnog porekla ( $15,8 \pm 12,8$  nmol/L). Maligni tumori mezodermalnog porekla su imali najnižu srednju vrednost FK ( $11,2 \pm 6,9$  nmol/L).

Srednje vrednosti FK nisu se statistički značajno razlikovale između maligniteta različitog embrionalnog porekla ( $F=1,128$ ;  $p>0,05$ ).



---

Grafikon 15. Vrednosti B12 u zavisnosti od embrionalnog porekla maligniteta



Na grafikonu 15 prikazane su srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> u zavisnosti od embrionalnog porekla tumora. Kako se na grafikonu može videti, najviše vrednosti vitamina B<sub>12</sub> zabeležene su kod malignih bolesti mezodermalnog porekla (350,8 ± 286,1 pmol/L), a zatim su sledili maligniteti endodermalnog (244,3 ± 184,5 pmol/L) i ektodermalnog porekla (239,8 ± 129 pmol/L). Tumori mešovitog embrionalnog porekla su imali najnižu srednju vrednost vitamina B<sub>12</sub> (192 pmol/L).

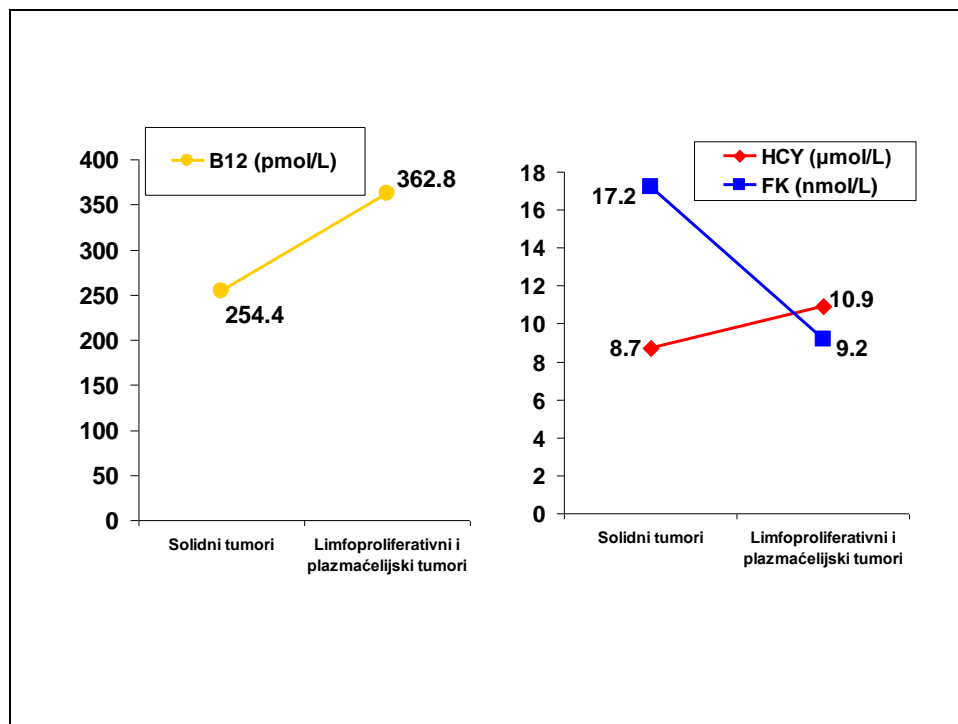
Srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> nisu se statistički značajno razlikovale između maligniteta različitog embrionalnog porekla (F=0,724; p>0,05).

---

---

#### 4.5. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od vrste maligniteta

Grafikon 16. Srednje vrednosti HCY, FK i B12 u zavisnosti od vrste maligniteta



Grafikon 16 prikazuje srednje vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> kod solidnih tumora i limfoproliferativnih i plazmaćelijskih maligniteta. Kako se iz grafikona može videti, srednja vrednost HCY je bila viša kod limfoproliferativnih i plazmaćelijskih maligniteta ( $10,9 \pm 7,1 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na solidne tumore ( $8,7 \pm 5,2 \mu\text{mol/L}$ ). Srednje vrednosti FK su bile znatno više kod solidnih tumora ( $17,2 \pm 12 \text{ nmol/L}$ ) u odnosu na limfoproliferativna i plazmaćelijska oboljenja ( $9,2 \pm 5,4 \text{ nmol/L}$ ). Srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> bila je viša kod limfoproliferativnih i plazmaćelijskih maligniteta ( $362,8 \pm 323,9 \text{ pmol/L}$ ) u odnosu na srednju vrednost solidnih tumora ( $254,4 \pm 126,8 \text{ pmol/L}$ ).

Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 16 nađena je visoko statistički značajna razlika srednjih vrednosti FK zavisno od vrste maligniteta ( $t=2,781$ ;  $p<0,01$ ). Srednje vrednosti HCY zavisno od vrste maligniteta se nisu

---

---

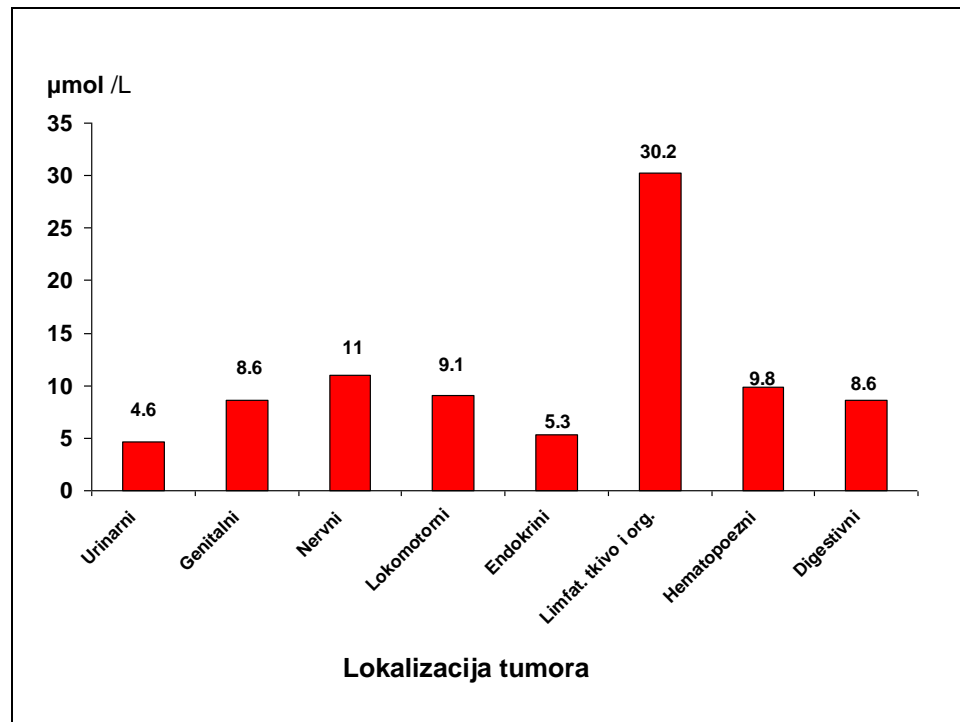
statistički značajno razlikovale ( $t=-1,124$ ;  $p>0,05$ ). Srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> zavisno od vrste tumora se nisu statistički značajno razlikovale ( $t=-1,306$ ;  $p>0,05$ ). Takođe, nađena je visoko statistički značajna korelacijska povezanost vrednosti FK i vrste tumora ( $r=0,432$ ;  $p<0,01$ ).

---

---

#### 4.6. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od lokalizacije maligniteta

Grafikon 17. Vrednosti HCY zavisno od lokalizacije maligniteta

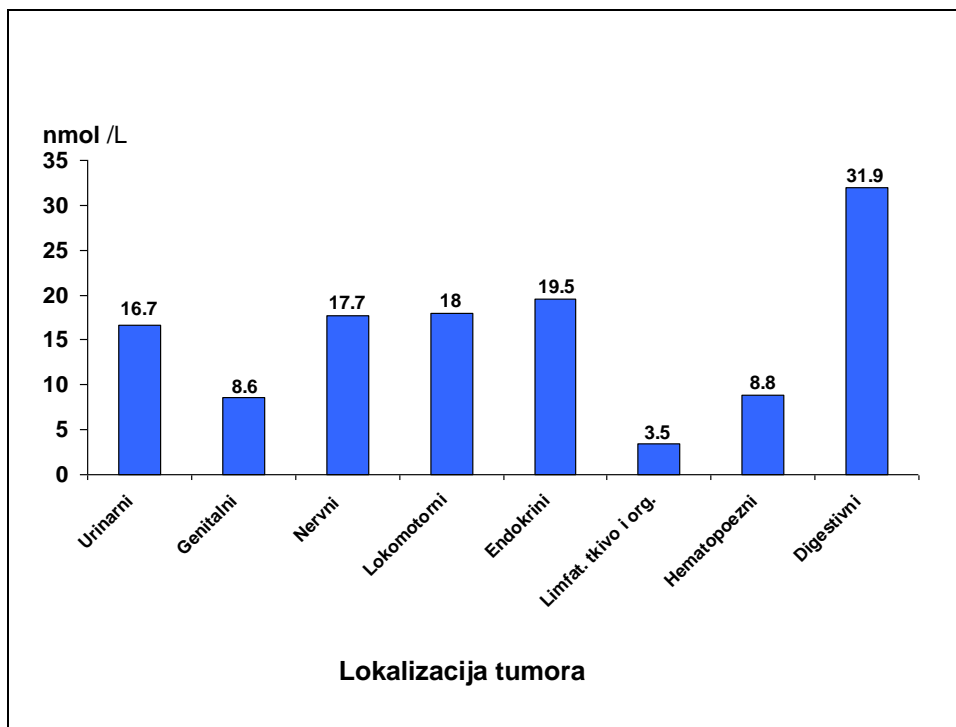


Na grafikonu 17 prikazane su srednje vrednosti HCY u zavisnosti od lokalizacije tumora. Kako se na grafikonu može videti, najviše vrednosti HCY zabeležene su kod tumora limfatičnog tkiva i organa (30,2 µmol/L). Ostale lokalizacije tumora imale su približno iste srednje vrednosti HCY pri čemu je lokalizacija tumora u nervnom sistemu imala najviše vrednosti HCY (11,0 µmol/L) a lokalizacija na urinarnom traktu najniže vrednosti HCY (4,6 µmol/L).

Srednje vrednosti HCY su se statistički značajno razlikovale između tumora različite lokalizacije ( $F=2,962$ ;  $p<0,05$ ).

---

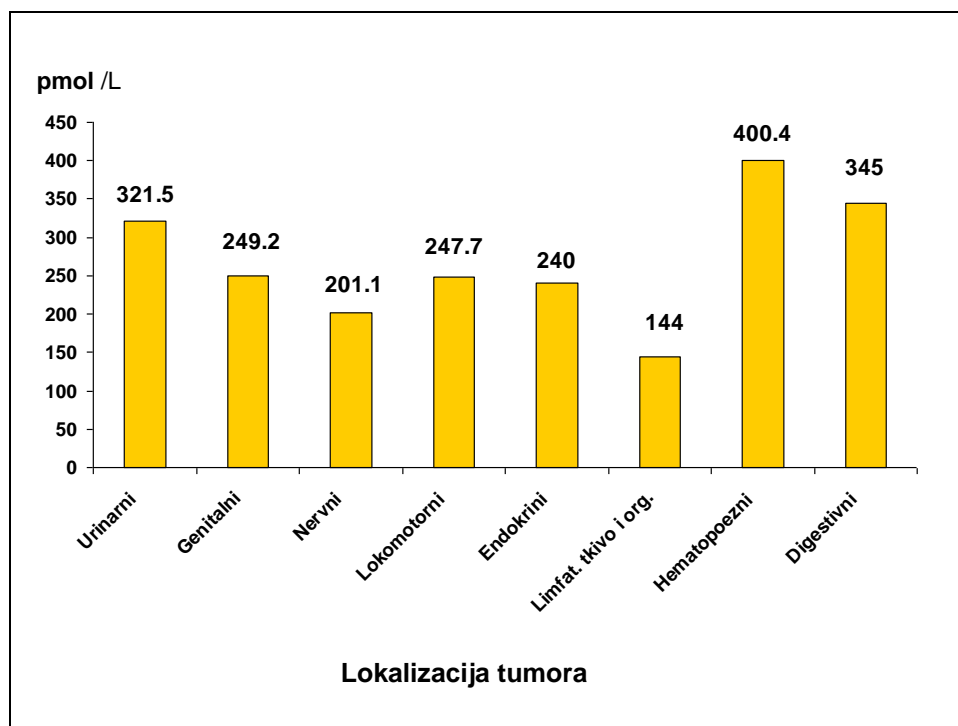
Grafikon 18. Vrednosti FK u zavisnosti od lokalizacije maligniteta



Na grafikonu 18 prikazane su srednje vrednosti FK u zavisnosti od lokalizacije maligne bolesti. Kako se na grafikonu može videti, najviše vrednosti FK zabeležene su kod tumora digestivnog trakta (31,9 nmol/L). Ostale lokalizacije tumora, osim genitalnih (8,6 nmol/L) i limfatičnog tkiva i organa (3,5 nmol/L) imale su približno iste srednje vrednosti FK koje su se kretale od 16,7 nmol/L (tumori urinarnog trakta) do 19,5 nmol/L (tumori endokrinog sistema).

Srednje vrednosti FK su se statistički značajno razlikovale između tumora različite lokalizacije ( $F=2,535$ ;  $p<0,05$ ).

Grafikon 19. Vrednosti B12 u zavisnosti od lokalizacije maligniteta



Na grafikonu 19 prikazane su srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> u zavisnosti od lokalizacije tumora. Kako se na grafikonu može videti, najviše vrednosti vitamina B<sub>12</sub> zabeležene su kod maligniteta kostne srži (400,4 pmol/L), zatim su sledili tumori digestivnog trakta (345 pmol/L) i urinarnog sistema (321,5 pmol/L). Najniža srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> zabeležena je kod ispitanika sa tumorima limfatičnog tkiva i organa (144 pmol/L).

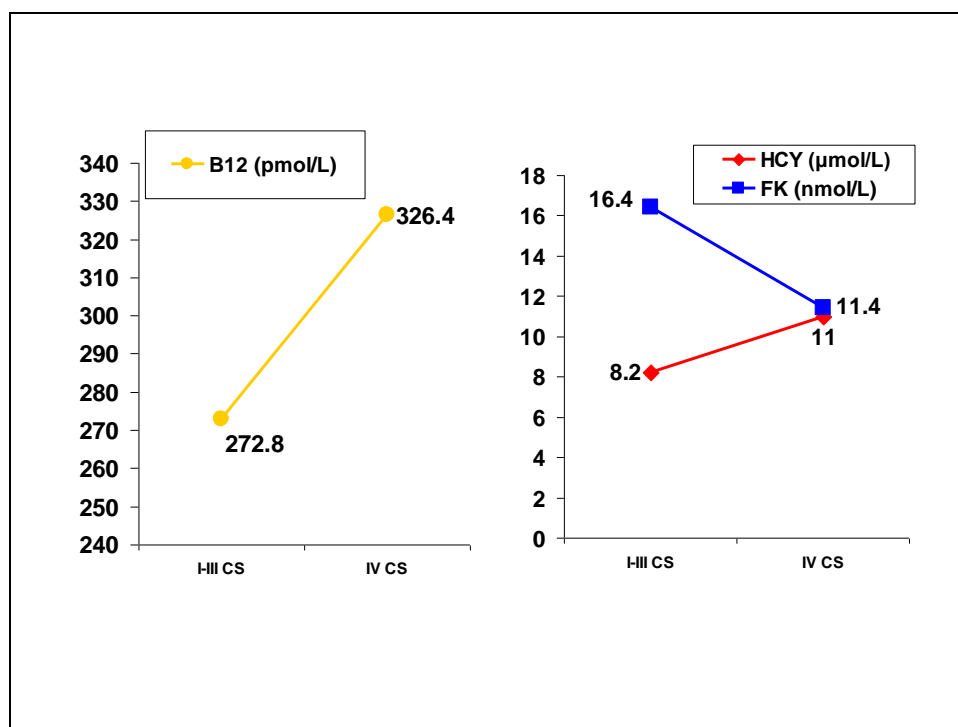
Srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> nisu se statistički značajno razlikovale između tumora različite lokalizacije (F=0,682; p>0,05).

---

---

#### 4.7. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od rasprostranjenosti bolesti

Grafikon 20. Srednje vrednosti HCY, FK i B12 u zavisnosti od rasprostranjenosti bolesti



Grafikon 20 prikazuje srednje vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> u zavisnosti od kliničkog stadijuma bolesti (CS) tj. rasprostranjenosti maligne bolesti. Kako se iz grafikona može videti, srednja vrednost HCY je bila niža kod nižih kliničkih stadijuma bolesti ( $8,2 \pm 6,1$  µmol/L) u odnosu na IV CS u kome je srednje vrednost HCY iznosila  $11 \pm 6,0$  µmol/L. Suprotno homocisteinu, FK je imala više vrednosti u nižim stadijumima bolesti ( $16,4 \pm 11,8$  nmol/L) u odnosu na viši stadijum bolesti ( $11,4 \pm 8,6$  nmol/L). Srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> ( $272,8 \pm 126,8$  pmol/L) bila je niža u nižim stadijumima bolesti u odnosu na IV CS u kome je srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> iznosila  $326,4 \pm 273,3$  pmol/L.

---

---

Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 20 nije nađena statistički značajna razlika srednjih vrednosti HCY ( $t=-1,442$ ;  $p>0,05$ ), FK ( $t=1,472$ ;  $p>0,05$ ) i vitamina B<sub>12</sub> ( $t=-0,720$ ;  $p>0,05$ ).

Međutim, nađena je statistički značajna korelacijska povezanost vrednosti HCY i rasprostranjenosti bolesti ( $r=0,327$ ;  $p<0,05$ ). Ova korelacijska povezanost pomenutih varijabli ukazuje da se u višim stadijumima maligne bolesti očekuju i više vrednosti homocisteina.

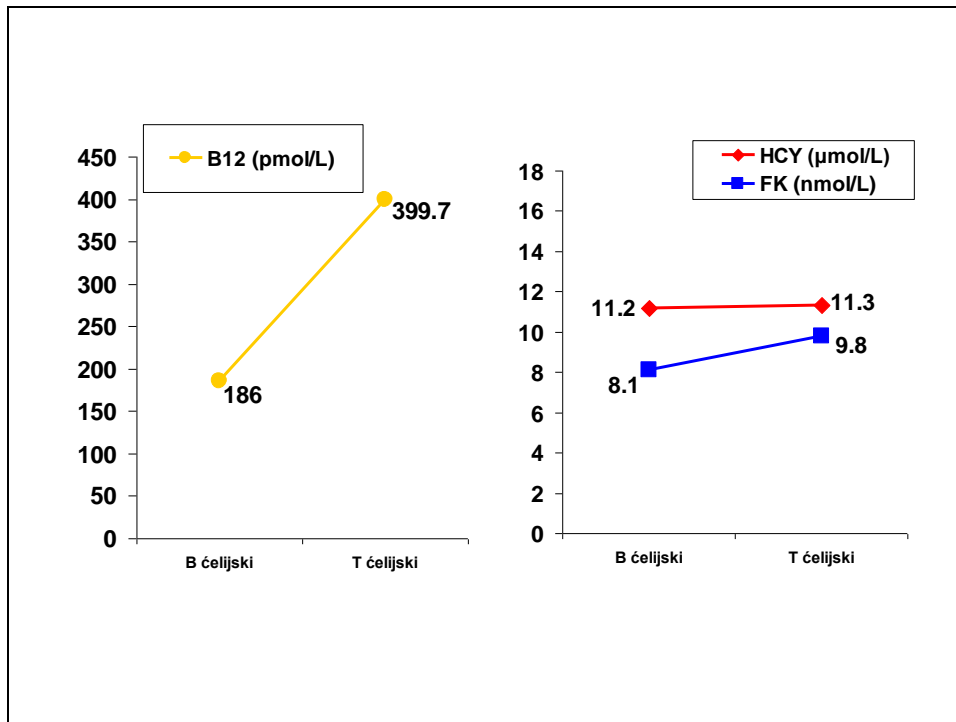


---

---

#### 4.8. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> kod B- i T-ćelijskih maligniteta kod ALL i NHL

Grafikon 21. Srednje vrednosti HCY, FK i B12 kod B- i T-ćelijskih maligniteta

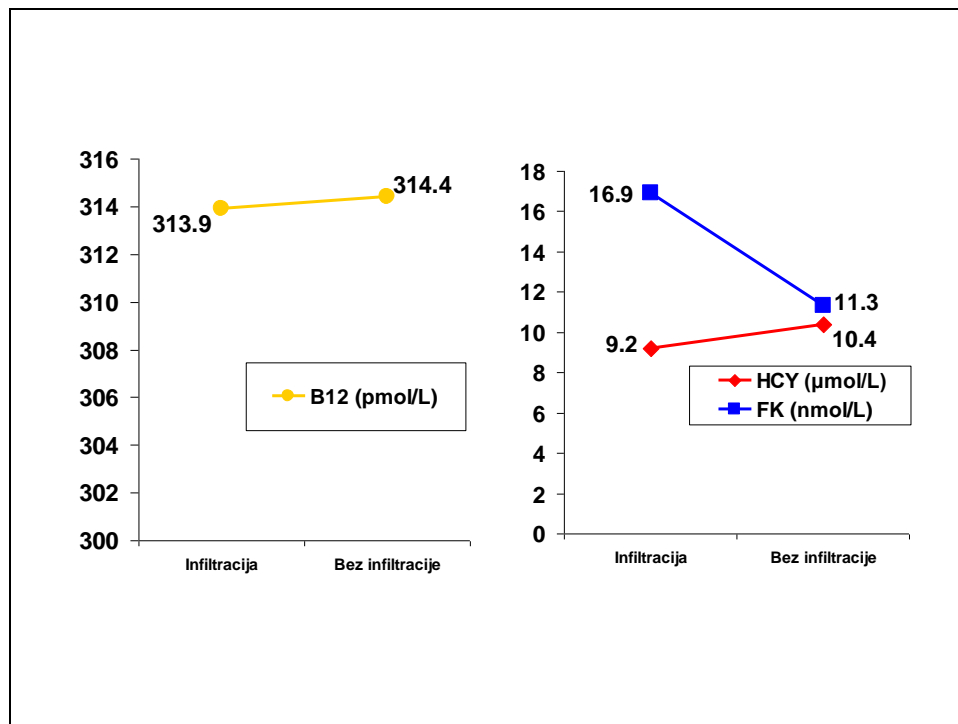


Grafikon 21 prikazuje srednje vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> kod B- i T-ćelijskih maligniteta, kod dece obolele od ALL i NHL. Kako se iz grafikona može videti, srednja vrednost HCY je bila skoro identična kod B- (11,2 ± 8,2 μmol/L) i T-ćelijskih maligniteta (11,3 ± 9,1 μmol/L). Srednja vrednost FK je bila nešto niža kod B- (8,1 ± 4,4 nmol/L) u odnosu na T-ćelijske malignitete (9,8 ± 6,7 nmol/L). Srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> je bila niža kod B- (186 ± 32,3 pmol/L) u odnosu na T-ćelijske malignitete (399,7 ± 208,7 pmol/L).

Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 21 nije nađena statistički značajna razlika srednjih vrednosti HCY ( $t=-0,013$ ;  $p>0,05$ ), FK ( $t=-0,485$ ;  $p>0,05$ ) i vitamina B<sub>12</sub> ( $t=-0,904$ ;  $p>0,05$ ).

#### 4.9. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od nalaza aspirata kostne srži

Grafikon 22. Srednje vrednosti HCY, FK i B12 zavisno od nalaza aspirata kostne srži



Grafikon 22 prikazuje srednje vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> u zavisnosti od rezultata aspirata kostne srži. Kako se iz grafikona može videti, srednja vrednost HCY bila je nešto niža kod ispitanika sa infiltracijom kostne srži ( $9,2 \pm 7,4 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na ispitanike kod kojih u aspiratu kostne srži nije nađena infiltracija ( $10,4 \pm 5,3 \mu\text{mol/L}$ ). Srednja vrednost FK bila je nešto viša kod ispitanika sa infiltracijom kostne srži ( $16,9 \pm 11,8 \text{ nmol/L}$ ) u odnosu na ispitanike bez infiltracije kostne srži ( $11,3 \pm 9,1 \text{ nmol/L}$ ). Srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> su skoro identične kod ispitanika sa infiltracijom ( $313,9 \pm 230,6 \text{ pmol/L}$ ) i onih bez infiltracije kostne srži ( $314,4 \pm 270,4 \text{ pmol/L}$ ).

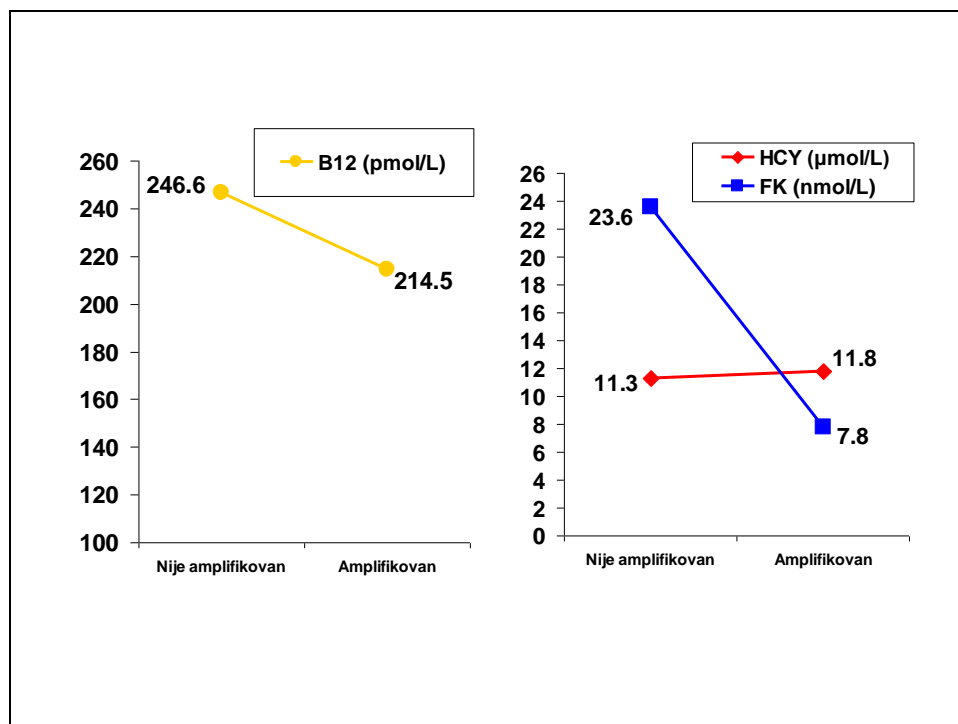
Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 22 nije nađena statistički značajna razlika srednjih vrednosti HCY ( $t=-0,570$ ;  $p>0,05$ ), FK ( $t=1,552$ ;  $p>0,05$ ) i vitamina B<sub>12</sub> ( $t=-0,05$ ;  $p>0,05$ ).

---

---

#### 4.10. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od N-myc amplifikacije ćelija neuroblastoma

Grafikon 23. Srednje vrednosti HCY, FK i B12 u zavisnosti od N-myc amplifikacije



Grafikon 23 prikazuje srednje vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> u zavisnosti od N-myc amplifikacije tumorskih ćelija neuroblastoma. Kako se iz grafikona može videti, srednja vrednost HCY je skoro identična kod ispitanika kod kojih nije postojala N-myc amplifikacija ( $11,3 \pm 7,9 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na ispitanike sa amplifikacijom ćelija ( $11,8 \pm 3,1 \mu\text{mol/L}$ ). Srednja vrednost FK je bila znatno viša kod ispitanika bez amplifikacije ( $23,6 \pm 16,5 \text{ nmol/L}$ ) u odnosu na ispitanike sa amplifikacijom ( $7,8 \pm 3,2 \text{ nmol/L}$ ). Srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> je bila nešto viša kod ispitanika bez amplifikacije ( $246,6 \pm 198 \text{ pmol/L}$ ) u odnosu na ispitanike kod kojih je postojala N-myc amplifikacija ( $214,5 \pm 106,8 \text{ pmol/L}$ ).

---

---

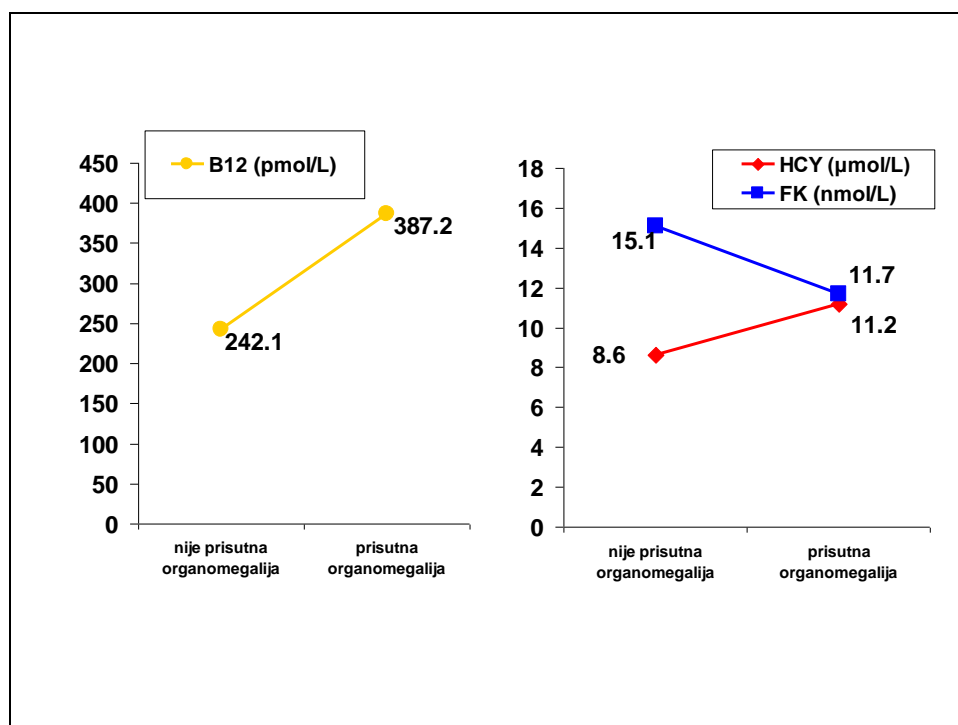
Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 23 nije nađena statistički značajna razlika srednjih vrednosti HCY ( $t=0,940$ ;  $p>0,05$ ), FK ( $t=0,100$ ;  $p>0,05$ ) niti vitamina B<sub>12</sub> ( $t=0,797$ ;  $p>0,05$ ).

---

---

#### 4.11. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od prisustva organomegalije

Grafikon 24. Srednje vrednosti HCY, FK i B12 u zavisnosti od prisustva organomegalije



Grafikon 24 prikazuje srednje vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> u zavisnosti od prisustva organomegalije. Kako se iz grafikona može videti, srednja vrednost HCY je bila nešto niža kod ispitanika kod kojih nije postojala organomegalija ( $8,6 \pm 4,6 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na ispitanike kod kojih je postojala organomegalija ( $11,2 \pm 7,7 \mu\text{mol/L}$ ). Srednja vrednost FK je bila viša kod ispitanika bez organomegalije ( $15,1 \pm 10,4 \text{ nmol/L}$ ) u odnosu na ispitanike sa organomegalijom ( $11,7 \pm 10,3 \text{ nmol/L}$ ). Srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> je bila nešto viša kod ispitanika sa oragnomegalijom ( $387,2 \pm 333,4 \text{ pmol/L}$ ) u odnosu na ispitanike kod kojih nije postojala organomegalija ( $242,1 \pm 108,8 \text{ pmol/L}$ ).

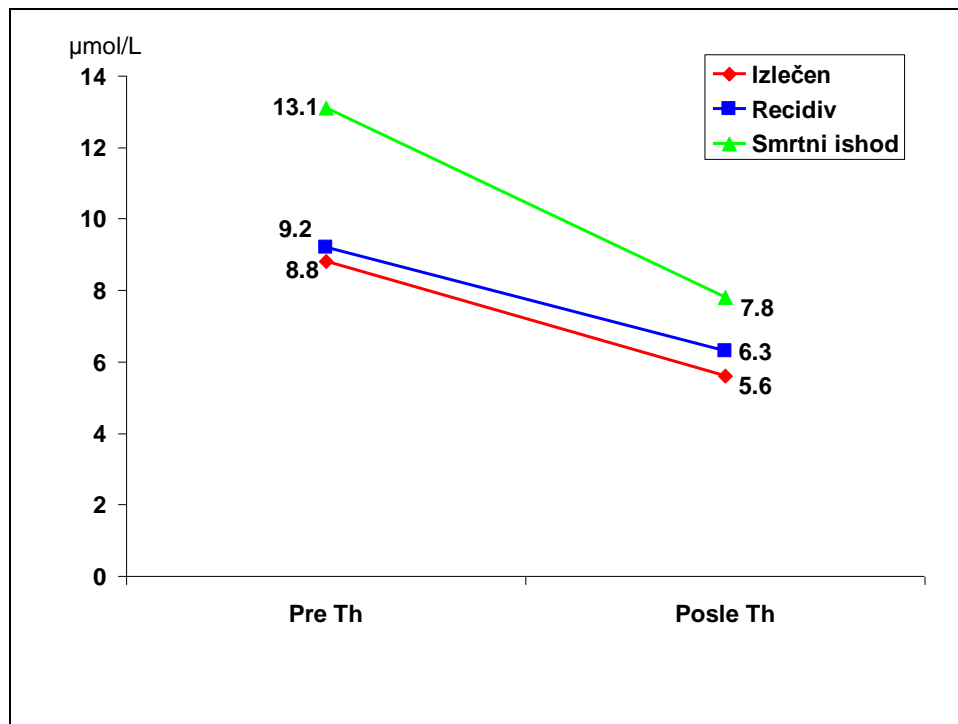
Statističkom analizom podataka prikazanih na grafikonu 24 nije nađena statistički značajna razlika srednjih vrednosti HCY ( $t=-1,288$ ;  $p>0,05$ ), FK ( $t=0,993$ ;  $p>0,05$ ) i vitamina B<sub>12</sub> ( $t=-1,678$ ;  $p>0,05$ ).

---

---

#### 4.12. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od ishoda bolesti

Grafikon 25. Srednje vrednosti HCY pre i posle celokupne terapije u zavisnosti od ishoda bolesti



Grafikon 25 prikazuje srednje vrednosti homocisteina pre i nakon terapije zavisno od ishoda bolesti. Kako se iz grafikona može videti, svi ishodi bolesti imali su niže vrednosti HCY nakon celokupne terapije. Ispitanici koji su izlečeni imali su najniže vrednosti HCY kako pre terapije ( $8,8 \pm 5,5 \mu\text{mol/L}$ ) tako i nakon celokupne terapije ( $5,6 \pm 3,5 \mu\text{mol/L}$ ). Ispitanici sa recidivom bolesti, imali su srednju vrednost HCY pre terapije  $9,2 \pm 4,4 \mu\text{mol/L}$  a nakon terapije  $6,3 \pm 1,3 \mu\text{mol/L}$ . Ispitanici sa smrtnim ishodom imali su najvišu srednju vrednost HCY kako pre terapije ( $13,1 \pm 8,1 \mu\text{mol/L}$ ) tako i nakon terapije ( $7,8 \pm 3,2 \mu\text{mol/L}$ ).

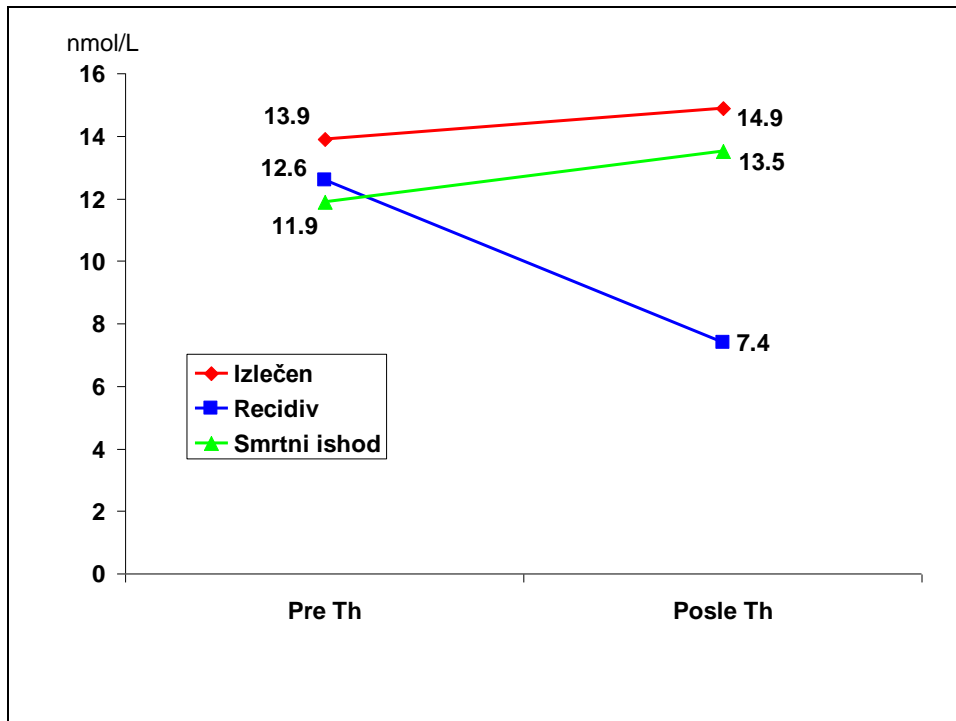
Srednje vrednosti HCY pre terapije se nisu statistički značajno razlikovale zavisno od ishoda bolesti ( $F=0,891$ ;  $p>0,05$ ), ista situacija je bila i sa srednjim vrednostima nakon terapije zavisno od ishoda bolesti ( $F=0,421$ ;  $p>0,05$ ). Samo

---

---

srednje vrednosti HCY kod ispitanika koji su za ishod imali izlečenje pokazuju statistički značajnu razliku srednjih vrednosti pre i nakon terapije ( $t=-2,290$ ;  $p<0,05$ ).

Grafikon 26. Srednje vrednosti FK pre i posle celokupne terapije u zavisnosti od ishoda bolesti

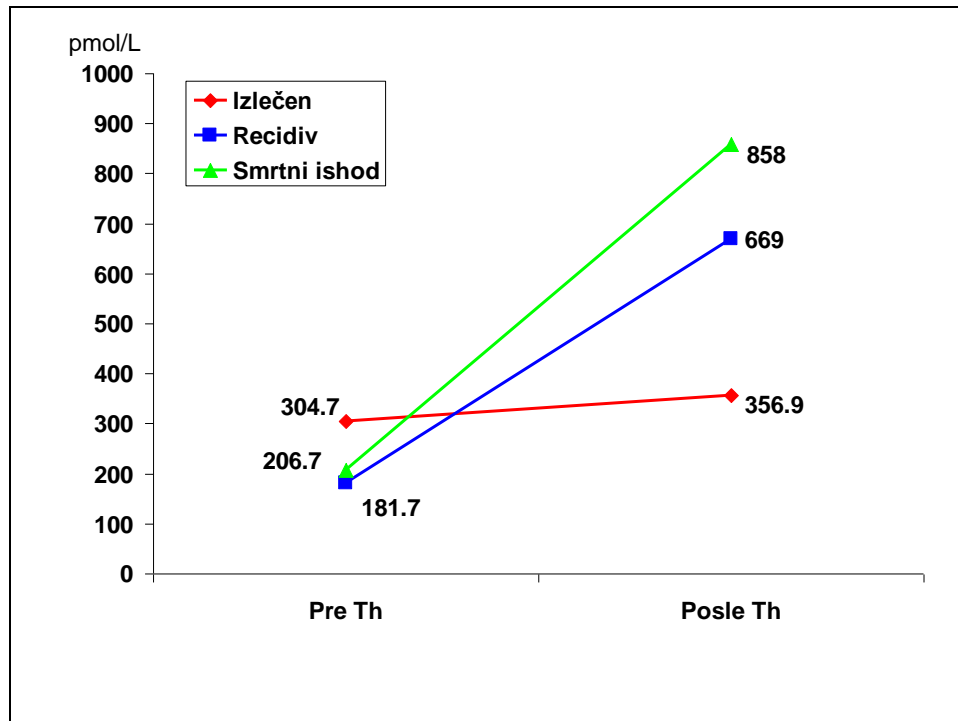


Grafikon 26 prikazuje srednje vrednosti folne kiseline pre i nakon terapije u zavisnosti od ishoda bolesti. Kako se iz grafikona može videti, ispitanici koji su izlečeni imali su najviše vrednosti FK kako pre terapije ( $13,9 \pm 10,7$  nmol/L) tako i nakon celokupne terapije ( $14,9 \pm 8,5$  nmol/L). Ispitanici sa recidivom bolesti su imali srednju vrednost FK pre terapije  $12,6 \pm 6,1$  nmol/L a nakon terapije  $7,4 \pm 3,4$  nmol/L što je bila i najniža zabeležena srednja vrednost nakon terapije. Ispitanici sa smrtnim ishodom imalu su najnižu srednju vrednost pre terapije ( $11,9 \pm 14$  nmol/L) dok je nakon terapije ta vrednost bila nešto viša i iznosila je  $13,5 \pm 8$  nmol/L).

Srednje vrednosti FK pre terapije se nisu statistički značajno razlikovale zavisno od ishoda bolesti ( $F=0,145$ ;  $p>0,05$ ), ista situacija je bila i sa srednjim vrednostima nakon terapije zavisno od ishoda bolesti ( $F=0,746$ ;  $p>0,05$ ). Srednje vrednosti FK se nisu statistički značajno razlikovale pre i posle terapije ni za jedan ishod bolesti pojedinačno ( $p>0,05$ ).



Grafikon 27. Srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> pre i posle celokupne terapije u zavisnosti od ishoda bolesti



Grafikon 27 prikazuje srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> pre i nakon terapije u zavisnosti od ishoda bolesti. Kako se iz grafikona može videti, ispitanici koji su izlečeni imali su najviše vrednosti B<sub>12</sub> pre terapije ( $304,7 \pm 239,3$  pmol/L) dok su ovi ispitanici nakon celokupne terapije imali najnižu zabeleženu srednju vrednost vitamina B<sub>12</sub> ( $356,9 \pm 268,9$  pmol/L). Ispitanici sa recidivom bolesti su imali najnižu srednju vrednost B<sub>12</sub> pre terapije  $181,7 \pm 52,3$  pmol/L, a nakon terapije ova vrednost je bila znatno viša ( $669 \pm 635$  nmol/L). Ispitanici sa smrtnim ishodom su imali srednju vrednost B<sub>12</sub> pre terapije  $206,7 \pm 49,5$  pmol/L, dok je nakon terapije ta vrednost bila najviša i iznosila je  $858 \pm 159,8$  pmol/L.

Srednje vrednosti B<sub>12</sub> pre terapije se nisu statistički značajno razlikovale zavisno od ishoda bolesti ( $F=1,821$ ;  $p>0,05$ ). Međutim, srednje vrednosti B<sub>12</sub> nakon terapije, zavisno od ishoda bolesti, pokazuju statistički značajnu razliku ( $F=3,467$ ;  $p<0,05$ ). Srednje vrednosti B<sub>12</sub> nakon terapije, između ispitanika koji su izlečeni i

---

---

onih sa smrtnim ishodom, pokazuju statistički značajnu razliku ( $t=2,558$ ;  $p<0,05$ ). Takođe, kod ispitanika sa smrtnim ishodom, srednja vrednost B12 nakon terapije je bila vrlo visoko statistički značajno viša u odnosu na srednju vrednost pre terapije ( $t=10,714$ ;  $p<0,001$ ).

Vrednosti vitamina B<sub>12</sub>, nakon celokupne terapije, pokazuju statistički značajnu korelacijsku povezanost sa ishodom bolesti ( $r=0,427$ ;  $p<0,05$ ). Ovo znači da su više vrednosti vitamina B<sub>12</sub> na kraju terapije, povezane sa smrtnim ishodom.

---

---

## 5. DISKUSIJA

Prema našem uvidu u literaturu, izuzev kod akutnih leukemija i malignih tumora centralnog nervnog sistema, nisu rađena opsežnija ispitivanja vezana za značaj homocisteina kod dece obolele od malignih oboljenja. Osnovno pitanje koje se nameće u našem istraživanju je kakav je dijagnostički i prognostički značaj homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> kod dece obolele od malignih bolesti.

### 5.1. Opšte karakteristike ispitivane grupe

Istraživanjem je obuhvaćeno 46 dece sa malignim oboljenjem uzrasta od 2 meseca do 215 meseci. Najviše ispitanika je bilo uzrasta 13 – 18 godina (30,4%). U populaciji dečaka, najzastupljeniji su bili ispitanici uzrasta 2 – 3 godine (28%), dok su u populaciji devojčica najzastupljenije bile ispitanice uzrasta 13 – 18 godina (38,1%). Razlika u distribuciji starosnih grupa je bila statistički značajna ( $p < 0,05$ ), ali se muški i ženski pol nije statistički značajno razlikovao u distribuciji starosnih grupa.

Najviše ispitanika je imalo malignitet mezodermalnog porekla (58,7%), dok su najređe bili zastupljeni maligniteti mešovito embriionalnog porekla (4,3%). Statističkom analizom podataka o embriionalnom poreklu maligniteta u ispitivanoj grupi nađena je vrlo visoko statistički značajna razlika ( $p < 0,01$ ). Nije nađena statistički značajna razlika u embriionalnom poreklu maligniteta zavisno od pola, distribucije uzrastnih grupa i uzrasta ispitanika.

U ispitivanoj populaciji dece, 63% dece je imalo solidni tumor, dok je 37% imalo limfoproliferativno ili plazmaćelijsko oboljenje. Analizom podataka o vrsti maligniteta u ispitivanoj grupi, vrsti maligniteta prema polu i uzrastu obolele dece, nije nađena statistički značajna razlika. U vreme postavljanja dijagnoze, deca obolela od limfoproliferativnih ili plazmaćelijskih oboljenja su bila starija u odnosu na decu obolelu od solidnih tumora, ali ta razlika nije bila statistički značajna.

Najzastupljeniji su bili maligniteti kostne srži (30,5%), a najređe zahvaćen je bio endokrini sistem (2,2%). Statističkom analizom podataka o lokalizaciji tumora u

---

---

ispitivanoj grupi nađena je vrlo visoko statistički značajna razlika ( $p < 0,01$ ). Najčešća lokalizacija tumora kod dečaka je bila kostna srž (40%) dok je kod devojčica to bio genitalni sistem (33,3%). Iako nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji lokalizacije tumora kod dečaka i devojčica, kod dečaka su visoko statistički značajno najčešći bili maligniteti kostne srži ( $p < 0,01$ ), za razliku od devojčica kod kojih nije nađena statistički značajna razlika distribucije lokalizacije tumora. Takođe je nađena statistički značajna korelacijska povezanost lokalizacije tumora i pola ( $p < 0,05$ ). Kada je analizirana lokalizacija maligniteta ispitanika različitih uzrastnih grupa, istraživanje je pokazalo da je 75% tumora urinarnog sistema bilo prisutno kod ispitanika uzrasta 2 – 3 godine, a da su tumori genitalnog sistema bili najčešći u uzrastu 13 – 18 godina (60%). Tumori nervnog sistema bili su najzastupljeniji u uzrastu 2 – 3 godine (44,4%) dok su tumori lokomotornog sistema (50%) i maligniteti kostne srži bili najzastupljeniji u uzrastu 10 – 12 godina. Svi tumori (100%) endokrinog sistema zabeleženi su u uzrastu 7 – 9 godina, tumori limfatičnog tkiva i organa u uzrastu 13 – 18 godina a tumori digestivnog sistema u dojenačkom uzrastu. Analiza podataka pokazala je visoko statistički značajnu razliku lokalizacije tumora zavisno od uzrasta ispitanika ( $p < 0,01$ ).

Poražavajući je podatak da je polovina ispitanika (50%) u našem istraživanju bila u IV kliničkom stadijumu bolesti u vreme postavljanja dijagnoze. U grupu bolesti u IV kliničkom stadijumu svrstani su rasprostranjeni maligni tumori (sa metastazama na udaljenim organima ili sa kriterijumima koji svrstavaju bolest u malignitet visokog ili najvišeg rizika). S obzirom da na prognozu malignih bolesti kod dece značajno utiče vreme otkrivanje bolesti, tj. rano otkrivanje bolesti je bitan preduslov povoljnog ishoda lečenja, jedan od ciljeva na polju dečje hematoonkologije u savremenom svetu je rano otkrivanje. Istraživanje je ukazalo da u našem društvu postoji nedovoljno razvijena svest o ovom problemu i da je to oblast koja se mora dramatično izmeniti i unaprediti.

Istraživanje je pokazalo da u ispitivanoj populaciji dece ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti oboljevanja od B- i T-ćelijskih maligniteta (analizirane su akutne limfoblastne leukemije i Nehodgkinski limfomi), iako su u opštoj populaciji B-ćelijski maligniteti znatno češći.

---

---

Kod ispitanika kod kojih je učinjena aspiracija kostne srži (87%), 57,5% je imalo infiltraciju. Nije nađena statistički značajna razlika između ispitanika sa i bez infiltracije kostne srži.

Određivanje N-myc amplifikacije u ćelijama neuroblastoma urađeno je kod 15,2% ispitanika, tj. isključivo kod dece obolele od neuroblastoma. Rađena je citohistohemija iz kulture ćelija neuroblastoma izolovanih iz tkiva tumora ili kostne srži. Kod većine ispitanika (71,4%) ćelije tumorskog tkiva nisu bile N-myc amplifikovane. Iako nije nađena statistički značajna razlika između ispitanika sa i bez amplifikacije, podatak da je većina ispitanika bila bez amplifikacije je značajan jer prisustvo amplifikacije u tumorskim ćelijama upućujeta veliki maligni potencijal tumorskih ćelija i loš je prognostički znak bolesti.

Među ispitanicima u našem istraživanju je statistički bilo značajno više ispitanika bez organomegalije (hepato i/ili splenomegalijom) nego onih sa organomegalijom ( $p < 0,05$ ).

Statističkom analizom distribucija normalnih i povišenih vrednosti tumor markera ( $\alpha$ -feto proteina,  $\beta$ -hCG i VMA i HVA u urinu) u ispitivanoj grupi, nije nađena statistički značajna razlika distribucije normalnih i povišenih vrednosti ni za jedan od analiziranih tumor markera.

Analizom distribucija normalnih i povišenih vrednosti transaminaza (SGOT i SGPT) kao i fibrinogena u ispitivanoj grupi, nađen je visoko statistički značajno veći broj ispitanika sa normalnim vrednostima sva tri posmatrana parametra ( $p < 0,01$ ).

---

---

## 5.2. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od terapijskog modaliteta – pre i nakon celokupne terapije

Analizom promena srednjih vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> u vreme postavljanja dijagnoze, tj. pre primene bilo koje terapije (inicijalna vrednost), kao i nakon završetka terapijskog tretmana (koji je obuhvatio kombinacije različitih terapijskih modaliteta – hemioterapiju, operativno lečenje i radioterapiju), utvrđen je statistički značajan pad vrednosti homocisteina i porast vrednosti vitamina B<sub>12</sub>, dok je vrednost folne kiseline ostala nepromenjena.

Pad vrednosti HCY nakon završetka lečenja ( $5,8 \pm 3,3 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na inicijalne vrednosti ( $9,3 \pm 6,8 \mu\text{mol/L}$ ) je bio visoko statistički značajan ( $p < 0,01$ ). Trend porasta srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> nakon završetka lečenja ( $422,1 \pm 320,6 \text{ pmol/L}$ ) u odnosu na inicijalnu srednju vrednost ( $258,1 \pm 165,9 \text{ pmol/L}$ ) je bio statistički značajan ( $p < 0,05$ ). Iako srednje vrednosti FK nisu pokazale statistički značajnu promenu pre i nakon lečenja, istraživanje pokazalo da postoji trend porasta srednje vrednosti FK nakon završetka lečenja u odnosu na inicijalne srednje vrednosti (inicijalna srednja vrednost je bila  $13,6 \pm 10,8 \text{ nmol/L}$ , a nakon završetka lečenja  $14,2 \pm 8,2 \text{ nmol/L}$ ).

Posmatrajući vrednosti HCY, FK i B<sub>12</sub> zavisno od referentnih vrednosti za dati uzrast, grupisali smo ispitanike prema smanjenim, normalnim i povišenim vrednostima pomenutih parametara. Zanimalo nas je da li su se i kako navedeni parametri promenili nakon završetka terapije, tj. koliko je ispitanika sa smanjenjem vrednosti parametara prešlo iz opsega povišenih u normalne ili smanjene vrednosti ili pak iz opsega normalnih u smanjene vrednosti što smo klasifikovali kao *smanjenje*. Takođe nas je zanimalo koliko je ispitanika sa povećanjem vrednosti parametara prešlo iz opsega smanjenih vrednosti u normalne ili povišene, odnosno iz normalnih u povišene što smo klasifikovali kao *povećanje*. Ispitanike kod kojih nije bilo promene vrednosti parametara iz jednog u drugi opseg vrednosti označili smo *bez promene*. Istraživanje je pokazalo da je najveći broj ispitanika nakon terapije imao smanjenje tj. prešao u niži opseg vrednosti HCY (52%) u odnosu na inicijalne vrednosti, pri čemu je ovo smanjenje bilo statistički značajno ( $p < 0,05$ ). Međutim, vrednosti FK kod najvećeg broja ispitanika (84%) ostale su u istom opsegu kao i pre

---

---

terapije što je bio slučaj i sa vrednostima B12 gde je 56% ispitanika ostalo u istom opsegu vrednosti u kome su bili i pre terapije.

Međutim, kada smo posmatrali promene nominalnih vrednosti HCY, FK i B12 nezavisno od opsega referentnih vrednosti, u cilju utvrđivanja da li je nakon terapije došlo do bilo kakve promene nominalnih vrednosti parametara u smislu smanjenja ili povećanja, utvrdili smo da je najveći broj ispitanika imao smanjenje nominalnih vrednosti HCY nakon terapije (68%) ( $p < 0,05$ ), a povećanje nominalnih vrednosti FK (52%) kao i B12 (60%).

Nakon sprovedenog lečenja maligne bolesti, bilo da je reč o operativnom lečenju ili primeni hemioterapije, došlo je do redukcije tumorske mase, što se manifestovalo statistički visoko značajnim padom srednjih vrednosti homocisteina u plazmi, statistički značajnim prelaskom u niži opseg vrednosti HCY i smanjenjem nominalnih vrednosti HCY. Ovakav nalaz nam sugerise da je koncentracija homocisteina u plazmi udružena sa poremećajem metabolizma homocisteina u tumorskim ćelijama i stepenom tumorske progresije i da kao takav može predstavljati potencijalni korisni marker tumorske aktivnosti, ne samo u diferencijalnoj dijagnozi već i za praćenje efikasnosti terapije. Iako su vrednosti FK i B12 kod najvećeg broja ispitanika ostale su u istom opsegu vrednosti pre i nakon terapije, statistički značajan porast u koncentraciji vitamina B<sub>12</sub> i zapaženi trend porasta folne kiseline (iako bez statističke značajnosti) nakon sprovedenog lečenja, kao i povećanje nominalnih vrednosti FK kao i B12 nakon terapije, pratili su fiziološki trend promene ovih kofaktora u metabolizmu homocisteina, tj. inverzni odnos koncentracije homocisteina i koncentracija vitamina B<sub>12</sub> i folne kiseline.

---

---

### **5.3. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od terapijskog modaliteta – pre i nakon operativnog lečenja**

Kada je reč o operativnom lečenju (OP), HCY pokazuje porast srednje vrednosti nakon OP ( $9,2 \pm 4,8 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na vrednost pre OP ( $7,6 \pm 7,8 \text{ nmol/L}$ ). Trend pada srednjih vrednosti nakon operativnog lečenja pokazuju vrednosti B<sub>12</sub> čija je srednja vrednost pre OP bila  $296,3 \pm 170,2 \mu\text{mol/L}$  a nakon OP  $212,1 \pm 120,6 \text{ pmol/L}$ , kao i srednja vrednost FK koja je pre OP bila  $23,9 \pm 14,9 \text{ nmol/L}$  a nakon OP  $12,3 \pm 6,4 \text{ pmol/L}$ . Nađen je statistički značajan pad srednje vrednosti FK nakon OP ( $p < 0,05$ ) kao i srednje vrednosti B<sub>12</sub> ( $p < 0,05$ ). Srednje vrednosti HCY ne pokazuju statistički značajnu promenu pre i nakon OP. Najveći broj ispitanika je nakon OP imao povećanje, tj. prešao je u viši opseg vrednosti HCY (57,2%) u odnosu na vrednosti pre OP. Međutim, vrednosti FK kod najvećeg broja ispitanika (62,4%) ostale su u istom opsegu kao i pre OP dok je vrednost B<sub>12</sub> kod najvećeg broja ispitanika prešla u niži opseg u odnosu na vrednosti pre OP (57,2%). Analizom distribucija promena nominalnih vrednosti HCY, FK i B<sub>12</sub> nakon OP u odnosu na vrednosti pre OP, kod svih ispitanika (100%) je došlo do smanjena vrednosti FK nakon operativnog lečenja što je bio slučaj i sa nominalnim vrednostima B<sub>12</sub>. Kod najvećeg broja ispitanika (62,4%) zabeležen je porast nominalnih vrednosti HCY nakon OP.

Operativni tretman je kod naših ispitanika podrazumevao redukciju tumorske mase koja se kretala u rasponu od urađene biopsije tumorskog tkiva do kompletne ekstirpacije tumora. S obzirom na ovako širok raspon redukcije tumorske mase, nije bilo moguće procenjivati promene HCY, FK i B<sub>12</sub> prema stepenu redukcije tumora. Međutim, ono što je bilo zajedničko svim pacijentima kod kojih je urađen operativni tretman jeste dodatno oštećenje tkiva do koga neizbežno dovodi hirurgija. Srednje vrednosti HCY se nisu statistički značajno promenile pre i nakon OP, ali je najveći broj ispitanika prešao u viši opseg vrednosti HCY i imao porast nominalnih vrednosti HCY nakon OP, što potvrđuje značaj HCY kao faktora tkivnog oštećenja, a ne samo markera tumorske aktivnosti. Srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> pokazale su statistički značajan pad nakon OP; najveći broj ispitanika je prešao u niži opseg vrednosti B<sub>12</sub> a svi su imali pad nominalnih vrednosti u odnosu na vrednosti pre OP.



---

---

Nakon OP, nađen je statistički značajan pad srednje vrednosti FK, najveći broj ispitanika je ostao u istom opsegu kao i pre OP, a svi ispitanici su imali pad nominalnih vrednosti FK.

Analizom promena prethodno navedenih parametara može se zaključiti da operativni tretman ne dovodi do pada HCY i porasta FK i B12, što bi se moglo očekivati s obzirom na to da se operacijom redukuje tumorska masa. Moguće objašnjenje za ovakav nalaz bi trebalo tražiti u činjenici da je oštećenje tkiva, koje neminovno prati svaku hirurgijsku intervenciju, praćeno porastom HCY. Ovakav nalaz je još jedna potvrda kompleksnosti dinamike promena homocisteina kod malignih bolesti i da se one ne mogu posmatrati samo sa aspekta nedostatka folata i vitamina B<sub>12</sub>, kao ni redukcije tumorske mase.

---

---

#### **5.4. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od terapijskog modaliteta – pre i nakon hemioterapije**

Kada je analiziran uticaj hemioterapije (HT), istraživanje je pokazalo da je došlo do pada srednje vrednosti HCY nakon HT ( $5,9 \pm 3,5 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na vrednost pre HT ( $9,6 \pm 6,1 \text{ nmol/L}$ ). Ovaj pad srednje vrednosti HCY nakon HT je bio visoko statistički značajan ( $p < 0,01$ ). Trend porasta srednjih vrednosti nakon HT pokazale su vrednosti vitamina B<sub>12</sub> čija je srednja vrednost pre HT bila  $227,3 \pm 145,8 \text{ nmol/L}$  a nakon HT  $392,4 \pm 309 \text{ nmol/L}$ . Porast srednjih vrednosti nakon HT zabeležen kod B<sub>12</sub> je bio statistički značajan ( $p < 0,05$ ). Srednje vrednosti FK (pre HT  $12,5 \pm 8,8 \text{ pmol/L}$ , a nakon HT  $14,6 \pm 8,3 \text{ pmol/L}$ ) nisu pokazale statistički značajnu promenu pre i nakon HT ( $p > 0,05$ ), iako je i ovde prisutan trend porasta vrednosti nakon HT. Najveći broj ispitanika je nakon HT imao smanjenje tj. prešao je u niži opseg vrednosti HCY (52%) u odnosu na vrednosti pre HT. Vrednosti FK kod najvećeg broja ispitanika (73,1%) ostale su u istom opsegu kao i pre HT što je bio slučaj i sa vrednostima B<sub>12</sub> kod koga je takođe najveći broj ispitanika ostao u istom opsegu vrednosti kao pre HT (50%). Kada smo posmatrali distribuciju promena nominalnih vrednosti HCY, FK i B<sub>12</sub> nakon HT u odnosu na vrednosti pre HT, kod najvećeg broja ispitanika (80,8%) došlo je do smanjenja vrednosti HCY nakon HT. Kod najvećeg broja ispitanika (57,7%) zabeležen je porast vrednosti FK nakon HT što je bio slučaj i kod vrednosti B<sub>12</sub> gde je takođe najveći broj ispitanika (80,8%) imao povećanje vrednosti nakon HT.

Nakon primene hemioterapije, registrovan je visoko statistički značajan pad srednje vrednosti HCY; najveći broj ispitanika je prešao u niži opseg vrednosti HCY i imao pad nominalnih vrednosti HCY. Vitamin B<sub>12</sub> je pokazao statistički značajan porast srednjih vrednosti nakon HT; najveći broj ispitanika je ostao u istom opsegu vrednosti kao pre HT i imao porast nominalnih vrednosti. Srednje vrednosti FK nisu pokazale statistički značajnu promenu nakon HT, iako je i ovde bio prisutan trend porasta vrednosti nakon HT; najveći broj ispitanika je ostao u istom opsegu vrednosti kao pre HT i imao je porast nominalnih vrednosti FK.

---

---

### **5.5. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od terapijskog modaliteta – pre započinjanja lečenja i nakon hemioterapije i operativnog lečenja**

Analizirane su promene srednjih vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> pre započinjanja bilo kakve terapije i nakon OP, kojoj je prethodila primena hemioterapije (HT+OP). Ovom analizom su, naime, obuhvaćeni pacijenti koji su primali hemioterapiju pre operativnog lečenja, tako da je na ovaj način ispitivan zajednički uticaj hemioterapije i operativnog lečenja na promenu vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub>, pri čemu je analiziran samo jedan segment njihovog lečenja, a ne celokupno lečenje. Homocistein je pokazao porast srednje vrednosti nakon HT+OP ( $9,2 \pm 4,8 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na vrednost pre započinjanja terapije ( $7,6 \pm 7,8 \mu\text{mol/L}$ ). Trend pada srednjih vrednosti nakon HT+OP pokazuju vrednosti vitamina B<sub>12</sub> čija je srednja vrednost pre započinjanja terapije bila  $284,7 \pm 166,8 \text{ nmol/L}$  a nakon HT+OP  $212 \pm 144,1 \text{ nmol/L}$ , kao i srednja vrednost FK koja je pre započinjanja terapije bila  $23,5 \pm 15,4 \text{ pmol/L}$  a nakon HT+OP  $12,3 \pm 6,4 \text{ pmol/L}$ . Nađen je visoko statistički značajan pad srednje vrednosti B<sub>12</sub> nakon HT+OP u odnosu na vrednost pre započinjanja terapije ( $p < 0,01$ ). Takođe, statistički značajan pad srednje vrednosti nakon HT+OP zabeležen je kod FK ( $p < 0,05$ ). Srednje vrednosti HCY ne pokazuju statistički značajnu promenu srednjih vrednosti pre započinjanja terapije u odnosu na srednju vrednost nakon HT+OP.

Navedene promene srednjih vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> ukazuju da je metabolizam homocisteina kompleksan i zavisan od brojnih faktora a ne samo od redukcije broja malignih ćelija do kojih svakako dovodi hemioterapija u kombinaciji sa operativnim lečenjem. Citostatska terapija, kao i operacija, dovode i do oštećenja zdravih ćelija organizma, a ne samo malignih, što je moguće objašnjenje za poremećen metabolizam homocisteina kod kombinovanog lečenja kod koga dominira, suprotno očekivanju, statistički značajan pad srednjih vrednosti folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> uz porast vrednosti homocisteina, iako bez statističke značajnosti. Moguće je da je upravo oštećenje tkiva usled invazivnosti hirurških procedura u sklopu lečenja dominantni faktor koji dodatno dovodi do

---

---

povećanja homocisteina, pre nego što to čini citostatska terapija, jer su slični podaci dobijeni analizom promena navedenih parametara posmatranih pre i nakon samo primenjenog operativnog lečenja.

---

---

## **5.6. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od terapijskog modaliteta – pre započinjanja lečenja i nakon hemioterapije, radioterapije ili operativnog lečenja**

Analizirane su promene srednjih vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> pre započinjanja bilo kakve terapije i nakon HT, kojoj je prethodila radioterapija ili operativno lečenje (RT/OP+HT). Ovom analizom su obuhvaćeni pacijenti koji su, u sklopu lečenja maligne bolesti pre hemioterapije lečeni radioterapijom ili operativno, tako da je i na ovaj način ispitivan uticaj kombinovane terapije na promenu vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub>, pri čemu je analiziran segment lečenja, a ne kompletno lečenje. Homocistein je pokazao pad srednje vrednosti nakon RT/OP+HT ( $5,7 \pm 3,5 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na vrednost pre započinjanja terapije ( $9,8 \pm 7,7 \text{ nmol/L}$ ). Trend porasta srednjih vrednosti nakon RT/OP+HT pokazuju vrednosti vitamina B<sub>12</sub> čija je srednja vrednost pre započinjanja terapije bila  $238,7 \pm 165,9 \text{ nmol/L}$  a nakon RT/OP+HT  $352,8 \pm 304,4 \text{ nmol/L}$ , kao i srednja vrednost FK koja je pre započinjanja terapije bila  $14,9 \pm 12 \text{ pmol/L}$  a nakon RT/OP+HT  $15,9 \pm 8,7 \text{ pmol/L}$ . Nađen je statistički značajan pad srednje vrednosti HCY nakon RT/OP+HT u odnosu na vrednosti pre započinjanja terapije ( $p < 0,05$ ). Srednje vrednosti FK ne pokazuju statistički značajnu promenu pre započinjanja terapije u odnosu na srednju vrednost nakon RT/OP+HT, što je bio slučaj i sa srednjim vrednostima B<sub>12</sub>.

Statistički značajan pad srednje vrednosti HCY, praćen trendom porasta srednjih vrednosti FK i B<sub>12</sub>, iako bez statističke značajnosti, zapažen je kod pacijenata kod kojih je u sklopu lečenja pre hemioterapije primenjivana radioterapija ili operativno lečenje. Iako je reč o segmentu lečenja a ne o celokupnom lečenju, dobijeni su podaci skoro identični onima dobijenim analizom navedenih parametara pre i nakon kompletnog lečenja, što još jednom potvrđuje značaj homocisteina kao mogućeg markera tumorske aktivnosti.

---

---

## 5.7. Prihvaćeni markeri i transaminaze i korelacija sa homocisteinom

Istraživanje je pokazalo statistički značajnu korelacijsku povezanost inicijalnih vrednosti FK i vrednosti AFP ( $p < 0,05$ ). Naime, kod ispitanika sa višim vrednostima AFP nađene su i više vrednosti folne kiseline. Takođe, prisutna je statistički značajna korelacijska povezanost inicijalnih vrednosti B12 sa pozitivnošću VMA i HVA u urinu ( $p < 0,05$ ), što upućuje na to da kod ispitanika sa pozitivnim VMA i HVA u urinu možemo očekivati niže vrednosti B12. Vrednosti transaminaza (SGOT i SGPT) pokazuju statistički značajnu pozitivnu korelacijsku povezanost sa vrednostima B12 ( $p < 0,05$ ). Naime, kod ispitanika sa višim vrednostima transaminaza, može se očekivati viši nivo vitamina B<sub>12</sub>. Vrednosti SGOT pokazuju statistički značajnu pozitivnu korelacijsku povezanost sa vrednostima FK na kraju celokupne terapije ( $p < 0,05$ ).

Takođe su analizirane promene srednjih vrednosti MK i LDH pre primene bilo koje terapije i nakon završetka lečenja. Mokraćna kiselina pokazuje pad vrednosti nakon završetka terapijskog protokola ( $204,8 \pm 78,1 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na vrednosti pre primene bilo koje terapije ( $298,5 \pm 197 \mu\text{mol /L}$ ). Isti trend pada, ali znatno izraženiji u odnosu na MK, pokazuje i promena vrednosti LDH čija je srednja vrednost pre primene terapije bila  $1605,3 \pm 314,8 \text{ IJ/L}$  a nakon završetka terapijskog protokola  $241,4 \pm 47,3 \text{ IJ/L}$ . Statističkom analizom podataka nađen je statistički značajan pad vrednosti MK i LDH nakon završetka lečenja ( $p < 0,05$ ). Vrednosti MK su pokazale visoko statistički značajnu korelacijsku povezanost sa vrednostima HCY pre terapije ( $p < 0,01$ ), što znači da se kod ispitanika sa višim vrednostima MK pre terapije, mogu očekivati i više vrednosti HCY.

---

---

## **5.8. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od embrionalnog porekla maligniteta**

U istraživanju smo analizirali vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> kod tumora različitog embrionalnog porekla i zaključili da ova razlika nije statistički značajna.

Kada je reč o embrionalnom poreklu maligniteta, maligniteti ektodermalnog porekla su imali najviše, dok su maligniteti mešovitoeg embrionalnog porekla imali najniže srednje vrednosti HCY.

Najviše srednje vrednosti FK zabeležene su kod maligniteta endodermalnog porekla, dok su najniže imali maligniteti porekla mezoderma.

Najviše srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> imali su maligniteti mezodermalnog porekla, a najniže maligniteti mešovitoeg embrionalnog porekla.

---

---

## 5.9. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od vrste maligniteta

Srednja vrednost HCY je bila viša kod limfoproliferativnih i plazmaćelijskih malignih oboljenja ( $10,9 \pm 7,1 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na solidne tumore ( $8,7 \pm 5,2 \mu\text{mol/L}$ ). Srednje vrednosti FK su bile znatno više kod solidnih tumora ( $17,2 \pm 12 \text{ nmol/L}$ ) u odnosu na limfoproliferativna i plazmaćelijska oboljenja ( $9,2 \pm 5,4 \text{ nmol/L}$ ). Srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> bila je viša kod limfoproliferativnih i plazmaćelijskih maligniteta ( $362,8 \pm 323,9 \text{ pmol/L}$ ) u odnosu na srednju vrednost solidnih tumora ( $254,4 \pm 126,8 \text{ pmol/L}$ ).

Statističkom analizom podataka, nađena je visoko statistički značajna razlika srednjih vrednosti FK zavisno od vrste tumora ( $p < 0,01$ ) i visoko statistički značajna korelacijska povezanost vrednosti FK i vrste tumora ( $p < 0,01$ ). Naime, koncentracije folne kiseline kod limfoproliferativnih i plazma ćelijskih oboljenja bile su značajno niže u odnosu na koncentracije kod solidnih tumora, najverovatnije zbog različitih potreba za folnom kiselinom za *de novo* sintezu nukleotidnih prekursora. Pretpostavlja se da je transportni sistem visokog afiniteta za folnu kiselinu prekomerno aktiviran u kulturi leukemijskih ćelija, zbog čega leukemijske ćelije pacijenata sadrže veću koncentraciju folata nego neleukemijske ćelije u sličnom stadijumu razvoja, kao i da je odnos između folata u leukocitima i serumu značajno povećan.

Srednje vrednosti HCY i vitamina B<sub>12</sub> se nisu statistički značajno razlikovale između ove dve grupe.

Istraživanje je takođe pokazalo da je pad koncentracije homocisteina po završetku lečenja bio nešto izraženiji u grupi dece obolele od limfoproliferativnih i plazma ćelijskih poremećaja u odnosu na grupu dece sa solidnim tumorima, ali ni u jednoj od ove dve grupe pad koncentracije homocisteina nije bio statistički značajan.

Kod solidnih tumora, koncentracija folne kiseline je pokazala statistički značajan pad vrednosti, dok su koncentracije vitamina B<sub>12</sub> pokazale visoko statistički značajan porast vrednosti nakon sprovedene terapije.



---

---

Kod dece sa limfoproliferativnim i plazma ćelijskim poremećajima nije nađena statistički značajna razlika inicijalnih i ponovljenih vrednosti folne kiseline pre i nakon završetka terapije, kao ni vitamina B<sub>12</sub>, iako je prisutan porast njihovih koncentracija.

---

---

### **5.10. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od lokalizacije maligniteta**

Srednje vrednosti HCY i FK su se statistički značajno razlikovale između tumora različite lokalizacije ( $p < 0,05$ ). Naime, istraživanje je pokazalo da su maligniteti limfatičkog tkiva i organa imali najviše srednje vrednosti HCY i najniže srednje vrednosti FK i B<sub>12</sub>. Srednje vrednosti FK su bile najviše kod tumora digestivnog sistema.

Najviše srednje vrednosti HCY zabeležene su kod tumora limfatičnog tkiva i organa (30,2  $\mu\text{mol/L}$ ). Ostale lokalizacije su imale približno iste srednje vrednosti HCY pri čemu su tumori neurogenog porekla imali najviše vrednosti HCY (11,0  $\mu\text{mol/L}$ ) a tumori urinarnog trakta najniže vrednosti HCY (4,6  $\mu\text{mol/L}$ ).

Najviše srednje vrednosti FK zabeležene su kod tumora digestivnog trakta (31,9  $\text{nmol/L}$ ). Ostale lokalizacije tumora, osim genitalnih (8,6  $\text{nmol/L}$ ) i limfatičnog tkiva i organa (3,5  $\text{nmol/L}$ ) imale su približno iste srednje vrednosti FK koje su se kretale od 16,7  $\text{nmol/L}$  (tumori urinarnog trakta) do 19,5  $\text{nmol/L}$  (tumori endokrinog sistema).

Najviše srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> zabeležene su kod maligniteta kostne srži (400,4  $\text{pmol/L}$ ), zatim su sledili tumori digestivnog (345  $\text{pmol/L}$ ) i urinarnog sistema (321,5  $\text{pmol/L}$ ). Najniža srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> zabeležena je kod ispitanika sa tumorima limfatičnog tkiva i organa (144  $\text{pmol/L}$ ). Srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> nisu se statistički značajno razlikovale između tumora različite lokalizacije.

---

---

### **5.11. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od rasprostranjenosti bolesti**

Zavisno od kliničkog stadijuma bolesti (CS) tj. rasprostranjenosti maligne bolesti, srednja vrednost HCY je bila niža kod nižih kliničkih stadijuma bolesti ( $8,2 \pm 6,1$   $\mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na IV CS u kome je srednje vrednost HCY iznosila  $11 \pm 6,0$   $\mu\text{mol/L}$ . Suprotno HCY, FK je imala više vrednosti u nižim stadijumima bolesti ( $16,4 \pm 11,8$   $\text{nmol/L}$ ) u odnosu na viši stadijum bolesti ( $11,4 \pm 8,6$   $\text{nmol/L}$ ). Srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> ( $272,8 \pm 126,8$   $\text{pmol/L}$ ) bila je niža u nižim stadijumima bolesti u odnosu na IV CS u kome je srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> iznosila  $326,4 \pm 273,3$   $\text{pmol/L}$ . Statističkom analizom podataka nije, međutim, nađena statistički značajna razlika srednjih vrednosti HCY, FK i vitamina B<sub>12</sub>.

Međutim, nađena je statistički značajna korelacijska povezanost srednjih vrednosti HCY i rasprostranjenosti bolesti ( $p < 0,05$ ). Ova korelacijska povezanost pomenutih varijabli ukazuje da se u višim stadijumima maligne bolesti očekuju i više vrednosti homocisteina.

---

---

### **5.12. Homocistein, folna kiselina i vitamin vitamin B<sub>12</sub> kod B- i T-ćelijskih maligniteta kod ALL i NHL**

Istraživanje je pokazalo da se srednje vrednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> kod B- i T- ćelijskih maligniteta, kod dece obolele od ALL i NHL, nisu statistički značajno razlikovale. Naime, srednje vrednosti HCY su bile skoro identične kod B- ( $11,2 \pm 8,2 \mu\text{mol/L}$ ) i T-ćelijskih maligniteta ( $11,3 \pm 9,1 \mu\text{mol/L}$ ); srednja vrednost FK je bila nešto niža kod B- ( $8,1 \pm 4,4 \text{ nmol/L}$ ) u odnosu na T-ćelijske malignitete ( $9,8 \pm 6,7 \text{ nmol/L}$ ); srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> je bila niža kod B- ( $186 \pm 32,3 \text{ pmol/L}$ ) u odnosu na T-ćelijske malignitete ( $399,7 \pm 408,7 \text{ pmol/L}$ ).

---

---

### **5.13. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od nalaza aspirata kostne srži**

Pod pretpostavkom da je infiltracija kostne srži parametar rasprostranjenosti bolesti, bilo da se radi o primarnom malignitetu kostne srži ili o metastazama tumora drugih lokalizacija, analizirali smo vrednosti HCY, FK i B<sub>12</sub>. Statističkom analizom podataka, međutim, nije nađena statistički značajna razlika srednjih vrednosti HCY, FK i vitamina B<sub>12</sub>.

Srednja vrednost HCY bila je nešto niža kod ispitanika sa infiltracijom kostne srži ( $9,2 \pm 7,4 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na ispitanike kod kojih u aspiratu kostne srži nije nađena infiltracija ( $10,4 \pm 5,3 \mu\text{mol/L}$ ). Srednja vrednost FK bila je nešto viša kod ispitanika sa infiltracijom kostne srži ( $16,9 \pm 11,8 \text{ nmol/L}$ ) u odnosu na ispitanike bez infiltracije kostne srži ( $11,3 \pm 9,1 \text{ nmol/L}$ ). Srednje vrednosti vitamina B<sub>12</sub> su bile skoro identične kod ispitanika sa infiltracijom ( $313,9 \pm 230,6 \text{ pmol/L}$ ) i onih bez infiltracije kostne srži ( $314,4 \pm 270,4 \text{ pmol/L}$ ).

---

---

#### **5.14. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od N-myc amplifikacije ćelija neuroblastoma**

N-myc amplifikacija tumorskih ćelija neuroblastoma je faktor rizika koji upućuje na agresivnost i povećan maligni potencijal ćelija neuroblastoma, zbog čega smo želeli da utvrdimo da li postoje značajne razlike u vrednostima HCY, FK i B<sub>12</sub> kod dece sa i bez amplifikacije. Statističkom analizom podataka nije nađena statistički značajna razlika srednjih vrednosti HCY, FK, niti vitamina B<sub>12</sub>.

Srednja vrednost HCY je bila skoro identična kod ispitanika kod kojih nije postojala ( $11,3 \pm 7,9 \mu\text{mol/L}$ ) u odnosu na ispitanike kod kojih je postojala N-myc amplifikacija tumorskih ćelija neuroblastoma ( $11,8 \pm 3,1 \mu\text{mol/L}$ ). Srednja vrednost FK je bila znatno viša kod ispitanika bez amplifikacije ( $23,6 \pm 16,5 \text{ nmol/L}$ ) u odnosu na ispitanike sa amplifikacijom ( $7,8 \pm 3,2 \text{ nmol/L}$ ). Srednja vrednost vitamina B<sub>12</sub> je bila nešto viša kod ispitanika bez amplifikacije ( $246,6 \pm 198 \text{ pmol/L}$ ) u odnosu na ispitanike kod kojih je postojala N-myc amplifikacija ( $214,5 \pm 106,8 \text{ pmol/L}$ ).

---

---

### **5.15. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od prisustva organomegalije**

Prisustvo organomegalije, tj. hepatomegalije i splenomegalije, upućuje na povećanje tumorske mase usled infiltracije malignim ćelijama, najčešće kod limfoproliferativnih malignih oboljenja. Istraživanje je, međutim, pokazalo da ispitanici sa organomegalijom nemaju statistički značajno više vrednosti homocisteina.

Ispitanici kod kojih je bila prisutna organomegalija su imali nešto više srednje vrednosti HCY ( $11,2 \pm 7,7$   $\mu\text{mol/L}$ ) i vitamina B<sub>12</sub> ( $387,2 \pm 333,4$   $\text{pmol/L}$ ) i niže srednje vrednosti FK ( $11,7 \pm 10,3$   $\text{nmol/L}$ ) u odnosu na ispitanike bez organomegalije (HCY  $8,6 \pm 4,6$   $\mu\text{mol/L}$ , B<sub>12</sub>  $242,1 \pm 108,8$   $\text{pmol/L}$ , FK  $15,1 \pm 10,4$   $\text{nmol/L}$ ). Statističkom analizom podataka nije nađena statistički značajna razlika srednjih vrednosti HCY, FK i vitamina B<sub>12</sub>.

---

---

## 5.16. Homocistein, folna kiselina i vitamin B<sub>12</sub> u zavisnosti od ishoda bolesti

Svi ishodi bolesti imali su niže vrednosti HCY nakon celokupne terapije.

Ispitanici koji su izlečeni imali su najniže vrednosti HCY kako pre terapije ( $8,8 \pm 5,5 \mu\text{mol/L}$ ) tako i nakon celokupne terapije ( $5,6 \pm 3,5 \mu\text{mol/L}$ ).

Ispitanici sa recidivom bolesti, imali su srednju vrednost HCY pre terapije  $9,2 \pm 4,4 \mu\text{mol/L}$  a nakon terapije  $6,3 \pm 1,3 \mu\text{mol/L}$ .

Ispitanici sa smrtnim ishodom imali su najvišu srednju vrednost HCY kako pre terapije ( $13,1 \pm 8,1 \mu\text{mol/L}$ ) tako i nakon terapije ( $7,8 \pm 3,2 \mu\text{mol/L}$ ).

Srednje vrednosti HCY pre terapije, kao i one nakon terapije se nisu statistički značajno razlikovale zavisno od ishoda bolesti. S obzirom da su svi ishodi bolesti imali niže vrednosti homocisteina nakon celokupne terapije, a da se vrednosti homocisteina pre terapije, kao i one nakon terapije nisu statistički značajno razlikovale zavisno od ishoda bolesti, može se zaključiti da homocistein nema prediktivni značaj kod dece obolele od malignih bolesti, tj. nije dobar prediktivni faktor ishoda bolesti.

Međutim, srednje vrednosti HCY kod ispitanika koji su za ishod imali izlečenje pokazale su statistički značajnu razliku srednjih vrednosti pre i nakon terapije ( $p < 0,05$ ), što je potvrdilo značaj homocisteina kao markera tumorske aktivnosti.

Ispitanici koji su izlečeni imali su najviše vrednosti FK kako pre terapije ( $13,9 \pm 10,7 \text{ nmol/L}$ ) tako i nakon celokupne terapije ( $14,9 \pm 8,5 \text{ nmol/L}$ ).

Ispitanici sa recidivom bolesti su imali srednju vrednost FK pre terapije  $12,6 \pm 6,1 \text{ nmol/L}$  a nakon terapije  $7,4 \pm 3,4 \text{ nmol/L}$  što je bila i najniža zabeležena srednja vrednost nakon terapije.

Ispitanici sa smrtnim ishodom imali su najnižu srednju vrednost pre terapije ( $11,9 \pm 14 \text{ nmol/L}$ ) dok je nakon terapije ta vrednost bila nešto viša i iznosila je  $13,5 \pm 8 \text{ nmol/L}$ .

Srednje vrednosti FK pre terapije, kao ni one nakon terapije se nisu statistički značajno razlikovale zavisno od ishoda bolesti. Srednje vrednosti FK se,



---

---

takođe, nisu statistički značajno razlikovale pre i posle terapije ni za jedan ishod bolesti pojedinačno.

Ispitanici koji su izlečeni imali su najviše srednje vrednosti B12 pre terapije ( $304,7 \pm 239,3$  pmol/L) i najnižu zabeleženu srednju vrednost vitamina B<sub>12</sub> ( $356,9 \pm 268,9$  pmol/L) nakon završetka terapije.

Ispitanici sa recidivom bolesti su imali najnižu srednju vrednost B12 pre terapije ( $181,7 \pm 52,3$  pmol/L), a nakon terapije ova vrednost je bila znatno viša ( $669 \pm 635$  nmol/L).

Ispitanici sa smrtnim ishodom su imali srednju vrednost B12 pre terapije  $206,7 \pm 49,5$  pmol/L, dok je nakon terapije ta vrednost bila najviša i iznosila je  $858 \pm 159,8$  pmol/L.

Srednje vrednosti B12 pre terapije se nisu statistički značajno razlikovale zavisno od ishoda bolesti. Međutim, rezultati istraživanja su pokazali da srednje vrednosti B12 nakon terapije pokazuju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) zavisno od ishoda bolesti. Srednje vrednosti B12 nakon terapije pokazuju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) između ispitanika koji su izlečeni i onih sa smrtnim ishodom. Takođe, kod ispitanika sa smrtnim ishodom, srednja vrednost B12 nakon terapije je bila vrlo visoko statistički značajno viša u odnosu na srednju vrednost pre terapije ( $p < 0,01$ ).

Vrednosti vitamina B<sub>12</sub>, nakon celokupne terapije, pokazuju statistički značajnu korelacijsku povezanost sa ishodom bolesti ( $p < 0,05$ ), tj. istraživanje je pokazalo da su više vrednosti vitamina B<sub>12</sub> na kraju terapije povezane sa smrtnim ishodom. Značaj ovog nalaza nije u potpunosti jasan. Jedan od razloga bi mogao biti podatak da je osam pacijenata imalo smrtni ishod, a da je, među njima, dvoje imalo upravo mijeloproliferativno oboljenje, kod kojih je vitamin B<sub>12</sub> inače veoma visok zbog povećanje proizvodnje transkobalamina I u granulocitima. Verovatniji razlog je ograničena senzitivnost i specifičnost vitamina B<sub>12</sub> u dijagnostičkoj primeni.

---

---

## 6. ZAKLJUČCI

1. Povišene koncentracije homocisteina su udružene sa malignitetom kod dece i homocistein bi mogao da se koristi kao dijagnostički, a verovatno i kao prognostički tumorski marker.
2. Homocistein bi pre mogao biti metabolički marker kojim bi se mogla pratiti tumorska aktivnost nego uzrok tumorogeneze.
3. Koncentracije homocisteina se ne menjaju statistički značajno pre i nakon operativnog lečenja, ali postoji statistički značajan pad srednje vrednosti folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub>.
4. Hemioterapija je dovela do visoko statistički značajanog pada koncentracije homocisteina, a vitamin B<sub>12</sub> je pokazao statistički značajan porast.
5. Ukoliko je hemioterapija primenjena pre operativnog lečenja, koncentracije homocisteina se statistički ne menjaju značajno nakon operacije ali je prisutan statistički značajan pad koncentracija folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub>.
6. Ukoliko je hemioterapiji prethodila radioterapija ili operativno lečenje, koncentracije homocisteina su bile statistički značajano niže nakon hemioterapije, dok su koncentracije folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> ostale nepromenjene.
7. Koncentracije homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> kod tumora različitog embrionalnog porekla nisu bile statistički značajno različite.

- 
- 
8. Koncentracije folne kiseline kod limfoproliferativnih i plazma ćelijskih oboljenja su bile statistički značajno niže u odnosu na koncentracije kod solidnih tumora, dok se koncentracije homocisteina i vitamina B<sub>12</sub> nisu statistički značajno razlikovale.
  9. Maligniteti limfatičkog tkiva i organa su imali statistički značajno najviše koncentracije homocisteina i najniže koncentracije folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub>, a koncentracije folne kiseline su bile statistički značajno najviše kod tumora digestivnog sistema.
  10. Istraživanje je pokazalo da se u višim stadijumima maligne bolesti očekuju i više koncentracije homocisteina.
  11. Istraživanje je pokazalo da se koncentracije homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> kod B- i T-ćelijskih maligniteta, kod dece obolele od ALL i NHL, statistički značajno ne razlikuju.
  12. Infiltracija kostne srži nije parametar koji utiče na promene u koncentracijama homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub>.
  13. N-myc amplifikacija tumorskih ćelija nije parametar koji utiče na promene u koncentracijama homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> kod dece obolele od neuroblastoma.
  14. Prisustvo organomegalije nije parametar koji utiče na promene u koncentracijama homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub>.
  15. Kod ispitanika sa višim vrednostima AFP možemo očekivati više vrednosti folne kiseline; kod ispitanika sa pozitivnim VMA i HVA u urinu možemo očekivati niže vrednosti vitamina B<sub>12</sub>; kod ispitanika sa višim vrednostima transaminaza, može se očekivati viši nivo vitamina B<sub>12</sub>; kod ispitanika sa

- 
- 
- višim vrednostima mokraćne kiseline pre terapije se mogu očekivati i više vrednosti homocisteina.
16. Svi ishodi bolesti imali su niže vrednosti homocisteina nakon celokupne terapije.
17. Koncentracije homocisteina kod ispitanika koji su za ishod imali izlečenje su bile statistički značajno niže nakon terapije.
18. Kontroverze su prisutne kada je reč o koncentracijama vitamina B<sub>12</sub>, jer je istraživanje pokazalo da su više vrednosti vitamina B<sub>12</sub> na kraju terapije povezane sa smrtnim ishodom.
19. Prediktivni značaj homocisteina, folne kiseline i vitamina B<sub>12</sub> za ishod bolesti zahteva dalje istraživanje.
20. Homocisteinemija se kod maligniteta kod dece ne može posmatrati samo sa aspekta nedostatka folne kiselina i vitamina B<sub>12</sub>.
21. Neophodna su dalja ispitivanja da bi se utvrdio značaj homocisteina kod dece obolele od malignih bolesti.

---

---

## 7. LITERATURA

1. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(2):324-32.
2. Brattstrom L, Wilcken DE. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr* 2000; 72(2):315-23.
3. Almadori G, Bussu F, Galli J, Cadoni G, Zappacosta B, Persichilli S, et al. Serum folate and homocysteine levels in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002; 94(4):1006-11.
4. Tibbetts SA, Appling RD. Compartmentalization of Mammalian Folate-Mediated One-Carbon Metabolism. *Ann Rev Nut* 2010; 30:57-81.
5. Eto I, Krumdieck CL. Role of vitamin B12 and folate deficiencies in carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1986; 206:313-30.
6. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270(22):2693-8.
7. Kato I, Dnistrian AM, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore RE, et al. Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women: a nested case-control study. *Br J Cancer* 1999; 79(11-12):1917-21.
8. Alberg AJ, Selhub J, Shah KV, Viscidi RP, Comstock GW, Helzlsouer KJ. The risk of cervical cancer in relation to serum concentration of folate, vitamin B<sub>12</sub> and homocysteine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(7):761-4.
9. Wu K, Helzlsouer KJ, Comstock GW, Hoffman SC, Nadeau MR, Selhub J. A prospective study on folate, B12, and pyridoxal 5'-phosphate (B6) and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8(3):209-17.
10. Stolzenberg-Solomon RZ, Albanes D, Nieto FJ, Hartman TJ, Tangrea JA, Rautalahti M, et al. Pancreatic cancer risk and nutrition-related methyl-group availability indicators in male smokers. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(6):535-41.
11. Nacci A, Dallan I, Bruschini L, Traino AC, Panicucci E, Bruschini P, et al. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B<sub>12</sub> levels in patients with laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134(12):1328-33.

- 
- 
12. Almadori G, Bussu F, Galli J, Cadoni G, Zappacosta B, Persichilli S, et al. Serum levels of folate, homocysteine, and vitamin B<sub>12</sub> in head and neck squamous cell carcinoma and in laryngeal leukoplakia. *Cancer* 2004; 103(2):284-92.
  13. Oikawa S, Murakami K, Kawanishi S. Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implication for carcinogenesis. *Oncogene* 2003; 22(23):3530-8.
  14. Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, Vinter DW, Richards EW, Krumdieck CL. Cigarette smoking, intracellular vitamin deficiency, and occurrence of micronuclei in epithelial cells of buccal mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4(7):751-8.
  15. Ji C, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol* 2004; 10(12):1699-708.
  16. Ruud E, Holmstrøm H, Brosstad F, Wesenberg F. Children with acute lymphoblastic leukaemia have high plasma levels of total homocysteine at time of diagnosis. *Scand J Clin Lab Invest* 2006; 66(1):67-78.
  17. Adiga S, Chandy S, Ramaswamy G, Appaji L, Krishnamorthy L. Homocysteine, vitamin B<sub>12</sub> and folate status in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Indian J Pediatr* 2008; 75(3):235-8.
  18. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 1991; 51:828-35.
  19. Olaf S. Clinical investigations (endothelial function and thrombosis), intracellular metabolism and cell culture studies with infectious agents: editorial. *Curr Drug Metabol* 2005; 6:1.
  20. Brosnan JT, Jacobs LR, Stead ML, Brosnan EM. Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim Pol* 2004; 51:405-13.
  21. Asok CA. Megaloblastic anemias. In: Hoffman R, Benz JE Jr, Shattil JS, Furie B, Silberstein EL, McGlave P, Heslop H, editors. *Hematology: Basic Principles and Practice*, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia:Churchill Livingstone Elsevier; 2009. p.497-9.

- 
- 
22. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy PG, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt SD, et al. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Molecul Genet Metabol* 2000; 70(4):310-5.
  23. Scott MJ, Weir GD. The methyl folate trap. *The Lancet* 1981; 318(8242):337-40.
  24. Tefferi A, Pruthi RK. The biochemical basis of cobalamin deficiency. *Mayo Clin Proc* 1994; 69(2):181-6.
  25. Christensen B, Refsum H, Vintermyr O, Ueland PM. Homocysteine export from cells cultured in the presence of physiological or superfluous levels of methionine: methionine loading of nontransformed, transformed, proliferating, and quiescent cells in culture. *J Cell Physiol* 1991; 146(1):52-62.
  26. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum. Methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39:1764-79.
  27. Rasmussen K, Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000; 37:627-48.
  28. Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987; 422:43-52.
  29. Asok CA. Megaloblastic anemias. In: Hoffman R, Benz JE Jr, Shattil JS, Furie B, Silberstein EL, McGlave P, Heslop H, editors. *Hematology: Basic Principles and Practice*, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2009. p.501-2.
  30. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004; 50:3-32.
  31. Rauh M, Verwied S, Knerr I, Dörr HG, Sönnichsen A, Koletzko B. Homocysteine concentrations in a German cohort of 500 individuals: reference ranges and determinants of plasma levels in healthy children and their parents. *Amino Acids* 2001; 20:409-18.

- 
- 
32. Nygård O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland homocysteine study. *J Am Med Assoc* 1995; 274:1526-33.
  33. Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Selhub J, Bowman BA, Gunter EW, et al. Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:482-9.
  34. Minniti G, Cerone R, Piana A, Armani U, Lorini R. Plasma and serum total homocysteine concentrations in paediatric patients, evaluated by high-performance liquid chromatography with fluorescence. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38(7):675-6.
  35. Papandreou D, Mavromichalis I, Makedou A, I. Rousso I, Arvanitidou M. Reference range of total serum homocysteine level and dietary indexes in healthy Greek schoolchildren aged 6 – 15 years. *Brit J Nutr* 2006; 96:719-24.
  36. Schneede J, Dagnelie PC, van Staveren WA, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Methylmalonic acid and homocysteine in plasma as indicators of functional Cobalamin deficiency in infants on macrobiotic diets. *Pediatr Res* 1994; 36:194-201.
  37. Tonstad S, Refsum H, Sivertsen M, Christophersen B, Ose L, Ueland PM. Relation of total homocysteine and lipid levels in children to premature cardiovascular death in male relatives. *Pediatr Res* 1996; 40:47-52.
  38. Delvin EE, Rozen R, Merouani A, Genest J Jr, Lambert M. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotype, age, vitamin B-12, and folate status on plasma homocysteine in children. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:1469-73.
  39. Bates CJ, Mansoor MA, Gregory J, Pentiev K, Prentice A. Correlates of plasma homocysteine, cysteine and cysteinyl-glycine in respondents in the British National Diet and Nutrition Survey of young people aged 4 – 18 years, and a comparison with the survey of people aged 65 years and over. *Br J Nutr* 2002; 87:71-9.



- 
- 
40. Minniti G, Cerone R, Piana A, Armani U, Lorini R. Plasma and serum total homocysteine concentrations in paediatric patients, evaluated by high-performance liquid chromatography with fluorescence. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38:675-6.
  41. Osganian SK, Stampfer MJ, Spiegelman D, Rimm E, Cutler JA, Feldman HA, et al. Distribution of and factors associated with serum homocysteine levels in children: child and adolescent trial for cardiovascular health. *J Am Med Assoc* 1999; 281:1189-96.
  42. Reddy MN. Reference ranges for total homocysteine in children. *Clin Chim Acta* 1997; 262:153-5.
  43. de Laet C, Wautrecht JC, Brasseur D, Dramaix M, Boeynaems JM, Decuyper J, et al. Plasma homocysteine concentration in a Belgian school-age population. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:968-72.
  44. Vilaseca MA, Moyano D, Ferrer I, Artuch R. Total homocysteine in pediatric patients. *Clin Chem* 1997; 43:690-2.
  45. Rauh M, Verwied S, Knerr I, Dorr HG, Sonnichsen A, Koletzko B. Homocysteine concentrations in a German cohort of 500 individuals: reference ranges and determinants of plasma levels in healthy children and their parents. *Amino Acids* 2001; 20:409-18.
  46. Minet JC, Bisse E, Aebischer CP, Beil A, Wieland H, Lutschg J. Assessment of vitamin B-12, folate, and vitamin B-6 status and relation to sulfur amino acid metabolism in neonates. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:751-7.
  47. Bjorke-Monsen AL, Ueland PM, Vollset SE, Guttormsen AB, Markestad T, Solheim E, et al. Determinants of cobalamin status in newborns. *Pediatrics* 2001; 108:624-30.
  48. Molloy AM, Mills JL, McPartlin J, Kirke PN, Scott JM, Daly S. Maternal and Fetal plasma homocysteine concentrations at birth: the influence of folate, vitamin B<sub>12</sub>, and the 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase 677C—>T variant. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:499-503.

- 
- 
49. Guerra-Shinohar EM, Paiva AA, Rondo PH, Yamasaki K, Terzi CA, D'Almeida V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B<sub>12</sub>. *BJOG* 2002; 109:784-91.
  50. Refsum H, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, et al. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr* 2006; 136(6):1731-40.
  51. Ueland PM, Monsen AL. Hyperhomocysteinemia and B-vitamin deficiencies in infants and children. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(11):1418-26.
  52. Merouani A, Lambert M, Delvin EE, Genest J Jr, Robitaille P, Rozen R. Plasma homocysteine concentration in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 2001; 16(10):805-11.
  53. Cardo E, Vilaseca MA, Campistol J, Artuch R, Colome C, Pineda M. Evaluation of hyperhomocysteinemia in children with stroke. *Eur J Paediatr Neurol* 1999; 3:112-7.
  54. Bauer AK. Hypercoagulable states. In: Hoffman R, Benz JE Jr, Shattil JS, Furie B, Silberstein EL, McGlave P, Heslop H, editors. *Hematology: Basic Principles and Practice*, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia:Churchill Livingstone Elsevier; 2009. p.2033.
  55. Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J. Functional vitamin B<sub>12</sub> deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1478-88.
  56. Solomon LR. Cobalamin-responsive disorders in the ambulatory care setting: unreliability of cobalamin, methylmalonic acid and homocysteine testing. *Blood* 2005; 105:978-85.
  57. Lievers KJA, Afman LA, Kluijtmans LAJ, Boers GHJ, Verhoef P, Den Heijer M, et al. Polymorphisms in the transcobalamin gene: association with plasma homocysteine in healthy individuals and vascular disease patients. *Clin Chem* 2002; 48:1383-9.
  58. von Castel-Dunwoody KM, Kauwell GPA, Shelnett KP, Vaughn JD, Griffin ER, Maneval DR, et al. Transcobalamin 776Gfi C polymorphism negatively effects vitamin B<sub>12</sub> metabolism. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:1436-41.

- 
- 
59. Gale DP, Cobbold JF, Chataway J. Steroid-responsive functional B<sub>12</sub> deficiency in association with functional transcobalamin II polymorphism 766 Cfi G. *Eur J Haematol* 2006; 76:75-8.
  60. Teplitsky V, Huminer D, Zoldan J, Pitlik S, Shohat M, Mittelman M. Hereditary partial transcobalamin II deficiency with neurologic mental and hematologic abnormalities in children and adults. *Isr Med Assn J* 2003; 5:868-72.
  61. Yee LD, Bollard M, Geaghan MS. Normal blood values: selected reference values for neonatal, pediatric, and adult populations. In: Hoffman R, Benz JE Jr, Shattil JS, Furie B, Silberstein EL, McGlave P, Heslop H, editors. *Hematology: Basic Principle and Practice*, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2009. p. 2435.
  62. Hillman R, Kenneth A, Henry M. Red blood cells disorders. In: Hillman R, Kenneth A, Henry M, editors. *Hematology in clinical practice: a guide to diagnosis and management*. 4<sup>th</sup> ed. The McGraw-Hill Companies, Inc; 2005. p. 98-9.
  63. Zhao R, Goldman ID. Resistance to antifolates. *Oncogene* 2003; 22:7431-57.
  64. Schrappe M. Evolution of BFM trials for childhood ALL. *Ann Hematol* 2004; 83(1):121-3.
  65. Whittle SL, Hughes RA. Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 3:267-71.
  66. Siveke JT, Folwaczny C. Medical approaches and future option in chronic active ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19(4):297-307.
  67. Adamson CP, Balis MF, Berg S, Blaney MS. General principles of chemotherapy. In: Pizzo AP, Poplack GD, editors. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2009. p. 318-22.
  68. Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP. Mechanism of action of methotrexate. *Immunopharmacology* 2000; 47:247-57.
  69. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N. Engl J Med* 1983; 309:1094-104.

- 
- 
70. Winter-Vann AM, Kamen BA, Bergo MO, Young SG, Melnyk S, Jill JS, Casey PJ. Targeting Ras signaling through inhibition of carboxyl methylation: an unexpected property of methotrexate PNAS 2003; 100(11):6529-34.
  71. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-adenosylmethionine and methylation FASEB J 1996; 4:471-80.
  72. Kobayashi K, Terada C, Tsukamoto I. Methotrexate-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy. Eur J Pharmacol 2002; 438:19-24.
  73. Paillot R, Genestier L, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard JP. Activation-dependent lymphocyte apoptosis induced by methotrexate. Transplant Proc 1998; 30:2348-50.
  74. Chern CL, Huang RF, Chen YH, Cheng JT, Liu TZ. Folate deficiency – induced oxidative stress and apoptosis are mediated via homocysteine-dependent overproduction of hydrogen peroxide and enhanced activation of NF- $\kappa$ B in human Hep G2 cells. Biomed Pharmacoter 2001; 55:434-42.
  75. Niyikiza C, Baker SD, Seitz DE, Walling JM, Nelson K, Rusthoven JJ, et al. Homocysteine and methylmalonic acid: markers to predict and avoid toxicity from pemetrexed therapy. Mol Cancer Ther 2002; 1:545-52.
  76. Kao CHS, Phan VH, Clarke SJ. Predictive markers for haematological toxicity of pemetrexed. Curr Drug Targ 2010; 11:48-57.
  77. Valík D, Radina M, Štěrba J, Vojtešek B. Homocysteine: a promising biomarker of folate antagonist chemotherapy. Klin Biochem Metab 2006; 14(35):75-83.
  78. Greenlund KJ, Srinivasan SR, Xu JH, Dalferes E Jr, Myers L, Pickoff A, et al. Plasma homocysteine distribution and its association with parental history of coronary artery disease in black and white children: the Bogalusa Heart Study. Circulation 1999; 99:2144-9.
  79. Kark JD, Sinnreich R, Rosenberg IH, Jacques PF, Selhub J. Plasma homocysteine and parental myocardial infarction in young adults in Jerusalem. Circulation 2002; 105:2725-9.
  80. Hyanek J, Stribrny J, Sebesta P, Klika M, Kramar J, Kozich V, et al. Diagnostic significance of mild hyperhomocysteinemia in a population of children with parents or grandparents who have peripheral or coronary artery disease. Cas Lek Cesk 1999; 138:333-6.

- 
- 
81. Morrison JA, Jacobsen DW, Sprecher DL, Robinson K, Khoury P, Daniels SR. Serum glutathione in adolescent males predicts parental coronary heart disease. *Circulation* 1999; 100:2244-7.
  82. Tonstad S, Refsum H, Sivertsen M, Christophersen B, Ose L, Ueland PM. Relation of total homocysteine and lipid levels in children to premature cardiovascular death in male relatives. *Pediatr Res* 1996; 40:47-52.
  83. van Beynum IM, Smeitink JA, den Heijer M, te Poele Pothoff MT, Blom HJ. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for ischemic stroke in children. *Circulation* 1999; 99:2070-2.
  84. Nowak-Gottl U, Strater R, Heinecke A, Junker R, Koch HG, Schuierer G, et al. Lipoprotein (a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin, And methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood. *Blood* 1999; 94:3678-82.
  85. Hogeveen M, Blom HJ, Van Amerongen M, Boogmans B, Van Beynum IM, Van De Bor M. Hyperhomocysteinemia as risk factor for ischemic and hemorrhagic stroke in newborn infants. *J Pediatr* 2002; 141:429-31.
  86. Koch HG, Nabel P, Junker R, Auberger K, Schobess R, Homberger A, et al. The 677T genotype of the common MTHFR thermolabile variant and fasting homocysteine in childhood venous thrombosis. *Eur J Pediatr* 1999; 158(3):113-6.
  87. Nelson R. Neonatal and childhood stroke remain underdiagnosed. *Lancet* 2002; 360:1306.
  88. Lilien M, Duran M, Van Hoeck K, Poll-The BT, Schroder C. Hyperhomocyst(e)inaemia in children with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:366-8.
  89. Krmar RT, Ferraris JR, Ramirez JA, Galarza CR, Waisman G, Janson JJ, et al. Hyperhomocysteinemia in stable pediatric, adolescents, and young adult renal transplant recipients. *Transplantation* 2001; 71:1748-51.
  90. Szabo AJ, Tulassay T, Melegh B, Szabo T, Szabo A, Vannay A, et al. Hyperhomocysteinaemia and MTHFR C677T gene polymorphism in renal transplant recipients. *Arch Dis Child* 2001; 85:47-9.

- 
- 
91. Schroder CH, de Boer AW, Giesen AM, Monnens LA, Blom H. Treatment of hyperhomocysteinemia in children on dialysis by folic acid. *Pediatr Nephrol* 1999; 13:583-5.
  92. Litwin M, Abuauba M, Wawer ZT, Grenda R, Kuryl T, Pietraszek E. Sulphur amino acids, vitamin B<sub>12</sub> and folic acid in children with chronic renal failure. *Pol Merkuriusz Lek* 2000; 8:268-9.
  93. Bennett-Richards K, Kattenhorn M, Donald A, Oakley G, Varghese Z, Rees L, et al. Does oral folic acid lower total homocysteine levels and improve endothelial function in children with chronic renal failure? *Circulation* 2002; 105:1810-5.
  94. Wiltshire E, Thomas DW, Baghurst P, Couper J. Reduced total plasma homocyst(e)ine in children and adolescents with type 1 diabetes. *J Pediatr* 2001; 138:888-93.
  95. Salardi S, Cacciari E, Sassi S, Grossi G, Mainetti B, Dalla Casa C, et al. Homocysteinemia, serum folate and vitamin B<sub>12</sub> in very young patients with diabetes mellitus type 1. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; 13:1621-7.
  96. Cotellessa M, Minniti G, Cerone R, Prigione F, Calevo MG, Lorini R. Low total plasma homocysteine concentrations in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24:969-71.
  97. Pavia C, Ferrer I, Valls C, Artuch R, Colome C, Vilaseca MA. Total homocysteine in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23:84-7.
  98. Glowinska B, Urban M, Peczynska J, Florys B, Szydłowska E. Elevated concentrations of homocysteine in children and adolescents with arterial hypertension accompanying type diabetes. *Med Sci Monit* 2001; 7:1242-9.
  99. Wollesen F, Brattstrom L, Refsum H, Ueland PM, Berglund L, Berne C. Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1999; 55:1028-35.
  100. Audelin MC, Genest J Jr. Homocysteine and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2001; 159:497-511.
  101. Wiltshire EJ, Gent R, Hirte C, Pena A, Thomas DW, Couper JJ. Endothelial dysfunction relates to folate status in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:2282-6.

- 
- 
102. Moyers S, Bailey LB. Fetal malformations and folate metabolism: review of recent evidence. *Nutr Rev* 2001; 59:215-24.
  103. van der Put NM, van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226:243-70.
  104. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151:862-77.
  105. Chadeaux B, Ceballos I, Hamet M, Coude M, Poissonnier M, Kamoun P, et al. Is absence of atheroma in Down syndrome due to decreased homocysteine levels? *Lancet* 1988; 2:741.
  106. Pogribna M, Melnyk S, Pogribny I, Chango A, Yi P, James SJ. Homocysteine metabolism in children with Down syndrome: in vitro modulation. *Am J Hum Genet* 2001; 69:88-95.
  107. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:495-501.
  108. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000; 67:623-30.
  109. O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet* 2002; 107:151-5.
  110. Wu LL, Wu JT. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor maker. *Clin Chim Acta* 2002; 322(1-2):21-8.
  111. Zhu BT. Medical hypothesis: hyperhomocysteinemia is a risk factor for estrogen induced hormonal cancer. *Int J Oncol* 2003; 22(3):499-508.
  112. Oikawa S, Murakami K, Kawanishi S. Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. *Oncogene* 2003; 22(23):3530-8.

- 
- 
113. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(7):3290-5.
114. Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Canc Epidemiol Biomark Prev* 2000; 9(8):849-53.
115. Schmutte C, Jones PA. Involvement of DNA methylation in human carcinogenesis. *Biol Chem.* 1998; 379(4-5):377-88.
116. Kawakami K, Ruskiewicz A, Bennett G, Moore J, Watanabe GO, Iacopetta B. The folate pool in colorectal cancers is associated with DNA hypermethylation and with a polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Cancer Res* 2003; 9(16):5860-5.
117. Kono S, Chen K. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer and adenoma. *Cancer Sci* 2005; 96(9):535-42.
118. Fang JY, Xiao SD. Folic acid, polymorphism of methyl-group metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2003; 38(9):821-9.
119. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004; 159(5):423-43.
120. Gershoni-Baruch R, Dagan E, Israeli D. Association of the C677 polymorphism in the MTHFR gene with breast and/or ovarian cancer risk in Jewish women. *Eur J Cancer* 2000; 36:2313-6.
121. Miao X, Xing D, Tan W, Qi J, Lu W, Lin D. Susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma and genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase in an at-risk Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:1454-8.
122. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:4004-9.



- 
- 
123. Zacho J, Yazdanyar S, Bojesen SE, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase c.677C>T polymorphism and risk of cancer: cross-sectional and prospective studies and meta-analyses of 75,000 cases and 93,000 controls. *Int J Cancer*. 2011; 128(3):644-52.
124. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298 C mutations. *Am J Human Genet* 2000; 67:986-90.
125. Kumar J, Das SK, Sharma P, Karthikeyan G, Ramakrishnan L, Sengupta S. Homocysteine levels are associated with MTHFR A1298C polymorphism in Indian population. *J Hum Genet* 2005; 50:655-63.
126. Taioli E, Garza AM, Ahn OY, Bishop TD, Bost J, Budai B, et al. Meta- and pooled analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and colorectal cancer: A HuGE-GSEC Review *Am J Epidemiol* 2009; 170(10):1207-21.
127. Hubner RA, Houlston RS. MTHFR C677T and colorectal cancer risk: a meta-analysis of 25 populations. *Int J Cancer* 2007; 120(5):1027-35.
128. Huang Y, Han S, Li Y, Mao Y, Xie Y. Different roles of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2007; 52(1):73-85.
129. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, et al. Polymorphisms in the methylene tetrahydrofolate reductase gene are associated With susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12810-15.
130. Wiemels JL, Smith RN, Tylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:4004-9.

- 
- 
131. Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:849-53.
132. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:4632-42.
133. James SJ, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny PI, Marie A, Caudill AM. Elevation in S-Adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J Nutr* 2002; 132:2361-6.
134. Sanjoaquin MA, Allen N, Couto E, Roddam AW, Key TJ. Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Int J Cancer* 2005; 113(5):825-8.
135. Ruud E, Holmstrøm H, Brosstad F, Wesenberg F. Children with acute lymphoblastic leukaemia have high plasma levels of total homocysteine at time of diagnosis. *Scand J Clin Lab Invest* 2006; 66(1):67-78.
136. Sirachainan N, Wongruangsri S, Kajanachumpol S, Pakakasama S, Visudtibhan A, Nuchprayoon I, et al. Folate pathway genetic polymorphisms and susceptibility of central nervous system tumors in Thai children. *Canc Detec Prev* 2008; 32:72-8.
137. Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard E, Theoret Y, Moghrabi A, et al. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004; 103:252-7.
138. Thompson JR, Gerald PF, Willoughby ML, Armstrong BK. Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against acute lymphoblastic leukemia in childhood: a case-control study. *Lancet* 2001; 358:1935-40.
139. Adiga S, Chandy S, Ramaswamy G, Appaji L, Kumari A, Krishnamoorthy L. Association between plasma homocysteine and riboflavin status in acute lymphoblastic leukemia in children. *Ind J Clin Biochem* 2009; 24(3):257-61.

- 
- 
140. Luckok M, Yates Z, Glanville T, Leeming R, Simson N, Daskakis A. A critical role for B-vitamin nutrition in human developmental and evolutionary biology. *Nutr Resear* 2003; 23:1463-75.
  141. Robien K, Ulrich CM. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk. A HuGe Minireview *Am J Epidemiol* 2003; 157:571-82.
  142. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12810-15.

---

## **Biografija autora**

Dragana Aleksić je rođena 3.6.1970. godine u Bajinoj Bašti. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu dana 6.2.1995. godine sa prosečnom ocenom 9,33. Specijalistički ispit iz pedijatrije položila je 6.12.2001. godine sa odličnim uspehom. Magistarsku tezu pod nazivom „Praćenje i karakter disritmija u dece posle operacije ventrikularnog septum defekta“ odbranila je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu dana 13.4.2005. godine, čime je stekla akademski naziv magistra medicinskih nauka.

Dragana Aleksić je od 1997. godine zaposlena u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Republike Srbije „Dr Vukan Čupić“, Novi Beograd i radi na odeljenju hematoonkologije.

U okviru stručnog usavršavanja u Srbiji, Dragana Aleksić je bila učesnik značajnog broja specijalističkih kurseva i seminara. Stručno usavršavanje u inostranstvu obavila je 2008. godine u Minneapolisu, na Pedijatrijskoj klinici Minnesota Univerziteta (Odeljenje hematoonkologije i Odeljenje kliničkog istraživanja).

Autor je i koautor više radova objavljenih u domaćim i stranim stručnim časopisima.

---

---

---

## Izjava o autorstvu

Potpisana M. Džyana Aleksić  
broj upisa /

### Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom „PROGNOSTIČKI ZNAČAJ VREDNOSTI HOMOCISTEINA, FOLNE KISELINE I VITAMINA B<sub>12</sub> U KRVI KOD DECE SA MALIGNIM BOLESTIMA“

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 27. 5. 2013.

M. Aleksić

---

---

---

---

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Dragana Aleksić

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada „PROGNOSTIČKI ZNAČAJ VREDNOSTI HOMOCISTEINA, FOLNE  
KISELINE I VITAMINA B<sub>12</sub> U KRVI KOD DECE SA MALIGNIM BOLESTIMA“

Mentor: Prof.dr Dragan M. Đurić

Potpisani \_\_\_\_\_ *M. Aleksić*

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 27.5.2013.

\_\_\_\_\_ *M. Aleksić*

---

---

---

---

## Izjava o korišćenju

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

„PROGNOSTIČKI ZNAČAJ VREDNOSTI HOMOCISTEINA, FOLNE KISELINE I VITAMINA B<sub>12</sub> U KRVI KOD DECE SA MALIGNIM BOLESTIMA“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranta

U Beogradu, 27. 5. 2013.



