

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**LÖSEMİ HÜCRE SERİSİNDE KAFEİK ASİT FENETİL
ESTER'İN TET2 EKSPRESYONU VE HÜCRE DÖNGÜSÜ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Muhammed Ali FURAL

TRABZON – 2019

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**LÖSEMİ HÜCRE SERİSİNDE KAFEİK ASİT FENETİL
ESTER'İN TET2 EKSPRESYONU VE HÜCRE DÖNGÜSÜ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzmanlık Tezi
Dr. Muhammed Ali FURAL

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet SÖNMEZ

TRABZON – 2019

ÖZET

Lösemi Hücre Serisinde Kafeik Asit Fenetil Ester'in TET2 Ekspresyonu ve Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi

Amaç: Akut Myeloid Lösemi (AML) patogenezindeki genetik ve epigenetik değişikliklerin kapsamlı olarak tanımlanmasıyla DNA metilasyonu ve histon metilasyon/asetilasyonu aracılı myeloid öncül hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında değişimlerin olduğu saptanmıştır. DNA metilasyonuna yol açan TET2 gen mutasyonlarının varlığında hücre döngüsü bozularak apoptozis inhibe olmaktadır. Bal arıları tarafından toplanan reçineli bir madde olan propolis ve etken maddesi kafeik asit fenetil ester (CAPE), antiinflamatuar, antiviral ve antikanser özellikleri bulunan bir bileşiktir. Bu çalışmada, K562 lösemi hücre serisinde CAPE'in hücre döngüsü ve TET2 gen ekspresyonu üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: K562 hücre serileri sitozin arabinozid (ARA-C), CAPE ile 37°C⁰ de 4 gün inkübe edilerek hücre döngüsü ve TET2 gen ekspresyonu değerlendirildi. TET2 mRNA ekspresyonu delta Ct metoduyla RPL0 ya karşı normalize edilerek hesaplandı. Hücre döngüsü basamakları Cycle TEST Plus DNA Reagent kit ile belirlendi. Hücrelerin DNA miktarları Modfit programında analiz edilip verilerin istatistiksel analizleri Grafpad prism V6 programı ve student's t-test kullanılarak yapıldı. P<0,05 anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Kontrol grubunda diploid hücrelerin %32.6'sı G1 fazında, %8'i G2 fazında, %59.4'ü S fazında, tetraploid hücre miktarı %5.6 ve hücrelerin %100'ü G1 fazında idi. Buna karşılık CAPE ilave edilen hücrelerde %93.59 oranında diploidi mevcut olup bunların %31.4'ünün G1 fazında, %8'inin G2 fazında olduğu gözlemlendi. Geri kalan %60.5 hücre ise S fazında saptandı. Kontrol gurubu ile CAPE eklenen hücre serilerinde hücre döngüleri arasında anlamlı fark olmadığı izlendi. 25 nM dozunda ARA-C ilave edilerek hazırlanan hücre kültürü akım sitometrik değerlendirmede diploid hücrelerin oranı %93.5 olup, bunların %31.4'ü G1, %8'i G2 ve %60.5'i S fazındaydı. Tetraploid hücre oranı %6.4 olup, tümünün G1 fazında olduğu izlendi. ARA-C ve 5 µM dozunda CAPE ilave edildiğinde hücrelerin %93.7'sinin diploid olduğu, %32.3'ünün G1 fazında, %8'inin G2 fazında,

%59.6'sının S fazında olduğu, tetraploid hücrelerin de %100'ünün G1 fazında olduğu saptandı. ARA-C ile karşılaştırıldığında anlamlı fark yoktu buna karşılık TET2 gen ekspresyonunun kontrol gurubuna göre CAPE varlığında 2,5 kat artığı izlendi ($p<0,001$).

Sonuç: CAPE'in K562 serilerinde hücre döngüsüne etki etmediği, TET2 gen ekspresyonunu artırması lösemi veya MDS tedavilerine CAPE eklenmesinin TET2 gen ekspresyonu artırıcı etkisiyle katkı sağlayabileceğini düşündürmekle birlikte, bu sonuçların ileri çalışmalarda desteklenmesi gerekmektedir.



SUMMARY

The Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on the Expression of TET2 and the Cell Cycle in a Leukemia Cell Line

Objective: A comprehensive definition of genetic and epigenetic alterations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia (AML) has shown that there are changes in the proliferation and differentiation of DNA methylation-mediated and histone methylation- and acetylation-mediated myeloid progenitors. In the presence of TET2 gene mutations that lead to DNA methylation, the cell cycle is disrupted, thereby inhibiting apoptosis. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is a bioactive component of propolis from honeybee hives and has antiinflammatory, antiviral, and anticarcinogenic properties. This study aimed to investigate the effect of CAPE on the expression of TET2 and the cell cycle in the K562 leukemia cell line.

Materials and Methods: The K562 leukemia cells were incubated with cytosine arabinoside (ARA-C) and CAPE at 37°C⁰ for 4 days to evaluate the cell cycle and the expression of TET2. TET2 mRNA expression was normalized against RPLP0 gene and calculated using the delta-delta Ct method. The distribution of cells within the different phases of the cell cycle was detected using the Cycletest Plus DNA Reagent Kit. DNA content of cells was analyzed using ModFit software. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Version 6. Student's t-test was used in the analysis. P < 0.05 was considered significant.

Results: In the control group, 32.6% of diploid cells were in the G1 phase, 8% in the G2 phase, and 59.4% in the S phase; the percentage of tetraploid cells was 5.6% and 100% of the cells were in the G1 phase. On the other hand, the percentage of diploid cells was 93.59% in CAPE-added cells; 31.4% of them were in the G1 phase and 8% in the G2 phase. The remaining 60.5% was in the S phase. There was no significant difference between the cell cycles of the control group cells and CAPE-added cells. The flow cytometric analysis of the cell culture treated with 25 nM ara-C showed that the percentage of diploid cells was 93.5% with 31.4% in the G1 phase, 8% in the G2 phase, and 60.5% in the S phase. The percentage of tetraploid cells was 6.4% and all tetraploid cells were in the G1 phase. In the cell culture treated with 5 µM CAPE and ara-C, the percentage of diploid cells was

93.7% with 32.3% in the G1 phase, 8% in the G2 phase, and 59.6% in the S phase. 100% of tetraploid cells were in the G1 phase. No significant difference was found compared to ara-C, while the expression of TET2 increased two and half time in the presence of CAPE compared to the control group ($p < 0.001$).

Conclusion: The study found that CAPE had no effect on the cell cycle in the K562 cell line but increased the expression of TET2. The effect of CAPE on the increased expression of TET2 might aid in the treatment of leukemia or myelodysplastic syndrome. Further research is required to support these results.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
SUMMARY	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Akut Myeloid Lösemi	2
2.1.1. Epidemiyoloji.....	2
2.1.2. Etiyoloji	2
2.1.3. Sınıflandırma	3
2.1.3.1. FAB Sınıflaması	4
2.1.3.2. WHO Sınıflaması	6
2.1.4. Klinik Özellikler	7
2.1.5. Laboratuvar Bulguları.....	9
2.1.5.1. Periferik Kan Bulguları	9
2.1.5.2. Kemik İliği Bulguları	10
2.1.5.3. Sitogenetik Bulgular.....	10
2.1.5.4. Biyokimyasal bulgular	12
2.1.5.5. İmmünofenotipleme	13
2.1.6. Prognostik Faktörler	13
2.1.7. Tedavi	14
2.1.8. Relaps ve Dirençli AML Tedavisi	16
2.1.8.1. Relaps ve Tedavi Direncinde Rol Oynayan Faktörler.....	16
2.1.8.2. Dirençli ve Relaps AML Olgularında Tedavi	16
2.1.9. Refrakter ve Relaps AML’de Devam Eden Çalışmalar.....	18
2.2. Propolis ve CAPE.....	20
2.2.1. Propolis	20
2.2.2. CAPE	20
2.2.3. Propolis ve CAPE’in Antitümöral Etkileri	21

2.2.4. Hücre Döngüsü	22
2.2.5. Epigenetik Düzenleyici Gen Mutasyonları.....	24
2.2.5.1. TET2 Gen Ekspresyonu	24
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. K562 Hücre Dizisi:	26
3.1.2. Projede Kullanılan Makine, Teçhizat ve Sarf Malzemeleri Listesi.....	27
3.1.3. Kimyasallar	27
3.1.4. Kitler.....	27
3.2. Metod	27
3.2.1. Hücrelerin Çoğaltılması	27
3.2.2. Hücre sayımı	27
3.2.3. RNA İzolasyonu ve Reverse Transkriptaz PCR.....	28
3.2.4. Kantitatif Real Time PCR (Qrt-PCR).....	29
3.2.5. Akım Sitometri ile ABC Taşıyıcı Antijenlerinin Tayini	29
3.2.6. Hücre Döngüsü Analizi	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. CAPE'in Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi	31
4.2. CAPE'n TET2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi	35
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇLAR.....	39
7. KAYNAKLAR	40

KISALTMALAR LİSTESİ

ADE	: Ara-C, Daunorubisin, Etoposid
AML	: Akut Myeloid Lösemi
ARA-C	: Sitozin Arabinozid
ATO	: Arsenik Trioxide
ATRA	: All Trans Retinoik Asit
BRCP	: Breast Cancer Resistance Protein
CALGB	: Cancer And Leukemia Group B
CAPE	: Caffeic Acid Phenethyl Ester
CDK	: Siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit
cMPO	: Sitoplazmik Myeloperoksidaz
CsA	: Siklosporin A
CXXC	: CXXC finger protein 4
ĐİK	: Dissemine İnvasküler Koagülasyon
DNA	: Deoksiribonükleik Asid
ECOG	: Eastern Cooperative Oncology Group
EMA	: Etoposid, Mitoxantron, Ara-C
FAB	: French-American-British
FLAG	: Fludarabin, Ara-C, G-CSF
FLT3	: Fms-related tyrosine kinase 3
G-CSF	: Granülosit Koloni Stimülan Faktör
gDNA	: Guanine quadruplex molecules
HLA	: Human Leukocyte Antigen
IDH2	: İzositrat dehidrogenaz 2
LAP	: Lökosit Alkalen Fosfataz
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LRP	: Lung Resistance Protein
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
MBD	: Metil-CpG-binding protein
MDR	: Multidrug Resistance
MDS	: Myelodisplastik Sendrom

MPO	: Myeloperoksidaz
mRNA	: Messenger Ribonükleik Asid
MRP	: MDR Related Protein
m-TOR	: The mammalian Target Of Rapamycin
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa B
nM	: Nanomolar
NSE	: Nöron Spesifik Enolaz
P-gp	: P-glycoprotein
PI3-K	: Fosfatidilinosid 3-Kinaz
RAEB-t	: Refractory Anemia with Excess Blast Transformation
Rb	: Retinoblastoma
SBB	: Sudan Black B
Skp2	: S-phase kinase associated protein 2
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TdT	: Terminal deoxynucleotidyl transferase
TET2	: TET methylcytosine dioxygenase 2
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	: World Health Organization
YDAC	: Yüksek Doz Ara-C
°C	: Santigrat derece
μl	: Mikrolitre
μM	: Micromolar
5hmC	: 5- hidroksimetilsitozin

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. AML gelişiminde rol oynayan/oynayabilen faktörler	3
Tablo 2. AML’de WHO Sınıflaması.....	7
Tablo 3. AML Hastalarında Sitogenetik Risk Değerlendirmesi	11
Tablo 4. AML’de morfolojik tiplene ve genetik değişimler arasındaki ilişki	12
Tablo 5. AML’de İmmunolojik Fenotipler	13
Tablo 6. AML’de Prognostik Faktörler	14
Tablo 7. AML tedavisindeki yeni ilaçların hedefleri	19

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1. Kontrol grubu K562 hücre dizilerinde diploid, tetraploid ve anaploid hücre guruplarında G1, G2, S fazındaki hücre yüzdeleri..... 31
- Şekil 2. CAPE ile muamele edilen K562 hücre dizisinde diploid, tetraploid ve anaploid hücre guruplarında G1, G2, S fazındaki hücre yüzdeleri..... 32
- Şekil 3. K562 hücre kültüründe ARA- C İle birlikte muamele edilen hücrelerin diploid, tetraploid ve anaploid hücre guruplarında G1, G2, S fazındaki hücre yüzdeleri 33
- Şekil 4. K562 hücre kültüründe CAPE ve ARA- C ile birlikte inkübe edilen hücrelerin diploid, tetraploid ve anaploid hücre guruplarında G1, G2, S fazındaki hücre yüzdeleri 33
- Şekil 5. K562 hücre dizisinde kontrol gurubu ve CAPE verilen hücre kültürünün TET2 gen ekspresyonu düzeylerinin karşılaştırmalı grafiği 34

1. GİRİŞ

Akut Myeloid Lösemi (AML) farklılaşma özellikleri bozulmuş myeloid öncü hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize klonal, heterojen neoplastik bir hastalıktır (1). Günümüzde konvansiyonel tedaviler ile genç yaştaki AML hastalarında %70-80 oranında tam remisyona elde edilebilirken, ileri yaş hastalarda tedaviye yanıt oranlarının %20-30'lara kadar azaldığı görülmektedir (2).

AML'li hastalarda gelişen genetik ve epigenetik değişiklikler doğrudan hücre döngüsünü etkileyerek veya DNA metilasyon ve histon metilasyon/asetilasyonu aracılı myeloid öncül hücrelerin proliferasyon ve differansiasyonunda değişimlere neden olarak apoptozis inhibisyonuna yol açmaktadır. DNA metilasyonuna neden olan TET2 gen mutasyonları AML'li hastalarda sıklıkla izlenmektedir. Son yıllarda AML'deki genetik ve epigenetik değişikliklerin kapsamlı olarak tanımlanmasıyla yeni tedavi yaklaşımları gelişmeye başlamıştır (3,4). Kafeik asit fenetil ester (CAPE), çeşitli bitki kaynaklarından bal arıları tarafından toplanan reçineli bir madde olan propolisin aktif biyolojik bileşenlerinden birisidir. Yapılan çalışmalarda CAPE'in antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, immün uyarıcı, karsinostatik ve antikanser etkilerinin olduğu gösterilmiştir (5,6). İnsan HeLa, HL-60, MCF-7 ve sıçan ME 308 hücre dizilerinde oksidatif stresi azaltarak hücre çoğalmasını engellediği, promyelositik bir lösemi hücre dizisi olan HL-60 hücrelerinde bcl-2 ekspresyonu azaltıp, bax ekspresyonu ve kaspaz-3 aktivasyonu artırarak apoptozisi indüklediği saptanmıştır (7-11).

Bu çalışmada K562 lösemi hücre serilerinde anti-tümör, anti-inflamatuvar, anti-neoplastik ve antioksidan etkili CAPE'in hücre döngüsü ve TET onkogen ailesinden olan TET2 geninin ekspresyonu üzerine etkilerin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Myeloid Lösemi

Akut myeloid lösemi (AML) farklılaşma özellikleri bozulmuş myeloid öncü hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize klonal heterojen neoplastik bir hastalıktır. Blastik hücrelerin bölünme ve proliferasyon özellikleri devam ederken, matür hücrelere farklılaşma özelliği kaybolmaktadır. Kemik iliğinde anormal çoğalan lösemik hücreler (blast) hematopoezin yetersizliğine yol açarak anemi, kanama ve enfeksiyonlara eğilimi artırmaktadır (1).

2.1.1. Epidemiyoloji

Akut myeloid lösemi erişkinlerde görülen akut lösemilerin yaklaşık %80'ini oluştururken çocukluk döneminde daha az görülmekte ve 15 yaş altındaki akut lösemilerin %15-20'sini oluşturmaktadır. AML genel olarak ileri yaş hastalığıdır ve ortalama görülme yaşı 65'tir. 65 yaş altında insidansı 1.8/100.000 iken, 65 yaş üzerinde 17/100.000'e ulaşmaktadır. Erkeklerde, kadınlara göre fark az olmakla beraber daha sık görülmektedir (100,000 kişide 5.2 erkek / 3.6 kadın). Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü verilerine göre her 100.000 kişide 4.3 oranında görüldüğü bildirilmiş olup 2019 yılında tüm kanser vakalarının %1.2'sinin AML olacağı ve 21.450 yeni vakanın olabileceği tahmin edilmektedir. (12-17).

2.1.2. Etiyoloji

Etiyolojisinde kromozomal değişiklikler ön planda yer almakta olup; iyonize radyasyon, kimyasal maddeler (benzen), ilaçlar (kemoterapötikler) ve retrovirüsler de rol oynamaktadır (Tablo 1) (18-23).

Tablo 1. AML Gelişiminde Rol Oynayan/Oynayabilen Faktörler

Çevresel Faktörler
Radyasyon Benzen Alkilleyici ajanlar ve diğer sitotoksik ilaçlar
Edinsel hastalıklar
Klonal myeloid hastalıklar; Kronik myeloid lösemi İdiopatik myelofibrozis Esansiyel trombositoz Polistemia vera Klonal sitopeniler; Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri Aplastik anemi Myeloma
Konjenital hastalıklar
Kardeş AML Konjenital amegakaryositik trombositopeni Bloom sendromu Konjenital agranülositoz Diamond-Blackfan sendromu Down sendromu Dubowitz sendromu Diskeratozis konjenita Ailesel platelet bozuklukları Fanconi anemisi Noonan sendromu Shwachman sendromu

2.1.3. Sınıflandırma

Akut myeloid lösemi’de ilk olarak histokimyasal reaksiyonlara, polikromatik boyamada morfolojik özelliklerine, hücre yüzey belirteçlerine göre French-American-British (FAB) sınıflaması yapılmıştır, ancak burada morfoloji ve immünolojik fenotip arasındaki ilişki zayıf olarak izlenmektedir (24).

Bunun üzerine Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bünyesinde bir grup patolog ve klinisyen tarafından AML sınıflandırılması yeniden gözden geçirilmiştir. FAB sınıflaması sadece hücre morfolojisi ve farklılaşma derecesine bağlı olduğundan WHO sınıflamasına prognoz ve tedavi açısından tümör genetiği ile ilgili yenilikler eklenmiştir (25-27).

2.1.3.1. FAB Sınıflaması

AML-M0 (Minimal farklılaşmış akut myeloid lösemi): AML vakalarının ortalama %3'ünü oluşturmaktadır. Morfolojik olarak ALL'nin L2 varyantından ayırırda immüfenotipleme önemli rol oynamaktadır. Myeloblastların sitoplazmalarında granül ve auer rod görülmemektedir. Blastların %3'ünden azında myeloperoksidaz (MPO) veya Sudan black B (SBB) pozitif olarak izlenmektedir. Lenfoid dizi belirteçlerinden CD7 %30-40 vakada eksprese edilirken diğer lenfoid belirteçler genellikle negatif olarak izlenmektedir. CD13 vakaların %75'inde, CD33 ekspresyonu ise %70'inde bulunmaktadır. AML-M0'da kompleks karyotip bozukluk sık olarak saptanmaktadır ve genellikle kötü prognoz ile ilişkilidir.

AML-M1 (Olgunlaşma göstermeyen akut myeloid lösemi): AML vakalarının %15-20'sini oluşturmaktadır. Myeloblastlarda auer rod nadir olarak izlenmektedir ya da yoktur. Ayrıca azurofilik granüller de nadir olarak saptanmaktadır. Myeloblastların %3'ten fazlasında MPO ve SBB pozitifdir. İmmüfenotiplemede CD13, CD33, CD34 ve HLA-DR pozitif olup, genetik anomali olarak inv(3) sık olarak izlenmektedir.

AML-M2 (Olgunlaşma gösteren akut myeloid lösemi): AML-M2 en sık rastlanan AML alt tipi olup tüm AML olgularının %25-30'unu oluşturmaktadır. Myeloblastlarda auer rod genellikle bulunmaktadır ve blastların sitoplazmaları azurofilik granüller içermektedir. Myeloblastlar kuvvetli MPO ve SBB pozitifliği göstermektedirler. İmmüfenotiplemede myeloblastlarda CD13, CD33, CD34 ve HLA-DR ekspresyonu pozitif olarak izlenmektedir. Morfolojik olarak promyelositler tüm myeloid serinin %3-20'sini oluşturmaktadır. Kemik iliğinde monositik hücreler noneritroid serinin %20'sinden daha az olup, AML-M2 vakalarının yaklaşık %50'sinde t(8;21)(q22;q22) translokasyonu izlenmektedir. Olguların yaklaşık %25'inde splenomegali izlenmektedir.

AML-M3 (Akut promyelositik lösemi): AML olgularının %5-10'unu oluşturmaktadır. Kemik iliği ve periferik kanda atipik promyelosit varlığı ile karakterizedir. Atipik promyelositler myeloid hücrelerin %30 veya daha fazlasını oluşturmaktadır. AML-M3 olguları morfoloji, hastaların genç olması (medyan yaş 30-33 yıl), spesifik kromozom anormalliği, koagülopati gelişebilmesi ve retinoik asit tedavisine cevap vermesi ile diğer AML alt tiplerinden ayrılmaktadır. Atipik

promyelositler kuvvetli MPO ve SBB pozitifliği göstermekte ve auer rod sık olarak izlenmektedir. İmmüfenotiplemede tipik olarak CD13, CD33 ve CD15 pozitifliği; CD11b, CD14, HLA-DR ve CD34 negatifliği saptanmaktadır. AML-M3'te karakteristik translokasyon, 15. ve 17. kromozomun uzun kolları arasındaki resiprokal t(15;17)(q22;q21) translokasyonudur. AML-M3 vakalarında granüllerden salınan prokoagülan maddelerin yol açtığı dissemine intravasküler koagülasyon (DİK) ve kanama bulguları sık olarak izlenmektedir. AML-M3'ün 2 varyantı vardır;

- **Hipergranüler varyant:** AML-M3 olgularının yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır. Atipik promyelositler, büyük sitoplazmik granüller veya auer rodlar (fagot hücreleri) içermektedirler ve hastalarda lökopeni ön planda izlenmektedir.
- **Mikrogranüler varyant:** AML-M3 olgularının %25'ini oluşturmaktadır. Atipik promyelositler, küçük granüller içeren sitoplazmaya ve katlanmış çekirdek yapısına sahiptirler. Hipergranüler varyantta lökopeni ön planda iken, mikrogranüler varyantta ise lökositoz ön planda izlenmektedir.

AML-M4 (Akut myelomonositik lösemi): AML'lerin %15-25'ini oluşturmaktadır. Kemik iliğinde %30'un üzerinde myeloblast varlığı yanında %20-50 arasında monositik hücreler görülmektedir. İmmüfenotiplemede CD13, CD33, CD14 ve HLA-DR pozitif olarak izlenmektedir. AML-M4 vakalarında splenomegali (%30), lenfadenopati (%19-30), dişeti tutulumu ve ekstramedüller tutulum izlenmektedir. AML-M4 vakalarının 1/3'ünü oluşturan anormal eozinofillerle birlikte olan M4Eo varyantında ise myelomonoblastik blastların yanında <%30 morfolojik olarak anormal eozinofiller mevcut olup, inv(16)(p13.1q22) kromozomal anomalisi görülebilmektedir ve iyi prognozla ilişkilidir.

AML-M5 (Akut monositik lösemi): AML'lerin %5-9'unu oluşturmaktadır. AML-M5'te CD11b, CD14, CD64 ve CD68 pozitifliği saptanabilmekte ve karaciğer, dalak ve lenf nodu gibi ekstramedüller tutulumlar diğer AML'lere göre daha sık olarak gözlenmektedir. AML-M5 vakalarının çoğunda lökositoz izlenmekte olup vakaların %30'unda lökosit sayısı 100.000/mm³'ün üzerindedir. AML M5'te t(9;11) translokasyonu kötü prognozla ilişkilidir. AML-M5a ve AML-M5b olmak üzere 2 alt tipi mevcuttur;

- **AML-M5a:** Kemik iliğindeki noneritroid serinin %80'den fazlasını monoblastlar oluşturmaktadır. Auer rod nadiren görülmekte ve AML-

M5a'da monoblastlarda NSE pozitifliği gözlenirken, MPO ve SBB genellikle negatif olarak izlenmektedir. AML-M5a'da olgular daha genç yaşta ve yüksek lökosit sayısı ile başvurumaktadırlar. AML-M5a vakalarında 11q23 anomalisi sık izlenen anomali olup kötü prognoz ile ilişkilidir.

- **AML-M5b:** Daha çok ileri yaşlarda görülmektedir. Kemik iliğinde noneritroid hücrelerin %80'inden fazlasını monosit, promonosit ve monoblastlar oluşturmaktadır. Auer rod myeloblastların az bir kısmında görülmektedir. NSE ile pozitif boyanma izlenmektedir.

AML-M6 (Akut eritrolösemi, Di Guglielmo sendromu): AML'lerin %5'ini oluşturmaktadır. AML-M6 hastaları sıklıkla ileri yaşta olup kemik iliğinde hücrelerin %50'sinden fazlasını eritroblast ve noneritroid hücrelerin %20'den fazlasını myeloblastlar oluşturmaktadır. MPO ve SBB negatif, PAS ise genellikle pozitif olup, immünofenotiplemede CD13, CD33, CD41, CD71 ve glikoforin pozitif olarak izlenmektedir. 5. ve 7. kromozom delesyonu sık olarak görülmektedir ve kötü prognoz ile ilişkilidir.

AML-M7 (Akut megakaryositik lösemi): AML'lerin %3-5'ini oluşturmaktadır ve prognozu kötüdür. MPO ve SBB negatif olarak izlenmektedir. Morfolojik olarak ALL-L2 ile karışabilmektedir. Myeloid belirteçlerden CD13 ve CD33 ekprese edilebilir ancak CD34 sıklıkla negatif olarak izlenmektedir. Tanı lösemi hücreleri üzerinde CD41, CD42b, CD61 veya faktör VIII ilişkili antijenlerin varlığına dayanmaktadır. Kemik iliği fibrozis nedeni ile güçlükçe aspire edilebilmektedir.

2.1.3.2. WHO Sınıflaması

WHO sınıflamasında morfoloji, sitogenetik, moleküler genetik ve immünolojik özelliklere dayanarak, universal olarak prognostik açıdan kullanılabilir bir sınıflandırma yapmak amaçlanmıştır (Tablo 2). WHO sınıflamasında, FAB sınıflamasına ek olarak birkaç önemli değişiklik yapılmıştır. WHO ve FAB sınıflaması arasındaki en önemli farklılık, WHO sınıflamasında tanı için kemik iliği ve kanda blast oranının en az %20 olarak tanımlanmış olmasıdır. Ayrıca FAB sınıflamasında myelodisplastik sendrom sınıfında yer alan, blast oranı

%20-29 olan aşırı blast transformasyonu olan refrakter anemi [refractory anemia with excess blast transformation (RAEB-t)] sınıfı kaldırılmıştır (25-27).

Tablo 2. AML’de WHO Sınıflaması

Tekrarlayan genetik anomalilerle seyreden AML
t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
t(15;17) (q22;q12) ile ilişkili AML ve varyantları; PML/RARA
inv(16)(p13q22) veya t(16;16)(p13;q22); CBFβ-MYH11
11q23 (MLL) anomalileri ile ilişkili AML
t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
inv(3)(q21q26.2) veya t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
Çoklu dizi displazisi gösteren AML
Öncesinde MDS olan AML
Öncesinde MDS olmayan AML
İlaça bağlı AML ve myelodisplastik sendromlar
Alkilleyici ajanlarla ilişkili
Topoizomeraz II inhibitör ile ilişkili
Tanımlanan gruplara girmeyen AML
Minimal farklılaşma gösteren AML
Olgunlaşma göstermeyen AML
Akut myelomonositik lösemi
Akut monoblastik lösemi
Akut eritroid lösemi
Akut megakaryoblastik lösemi
Akut bazofilik lösemi
Myelofibrozla giden akut panmyelozis
Myeloid sarkom

2.1.4. Klinik Özellikler

Akut myeloid lösemi hastalarının çoğunda tanıdan birkaç ay önce başlayan genel bir yorgunluk mevcut olup, iştahsızlık ve kilo kaybı da eşlik edebilir. Ancak hastalar genellikle sitopenilerle (anemi, nötropeni ve trombositopeni) ilişkili semptom ve bulgularla başvurumaktadırlar (28).

Anemiyle ilişkili solukluk ve halsizlik yaygın olarak gözlenmektedir. Ayrıca çarpıntı, çabuk yorulma ve dispne gibi diğer anemi ile ilişkili semptom ve bulgular da ortaya çıkabilmektedir. Trombositopeniye bağlı olarak gelişen peteşi, epistaksis, diş eti kanamaları, konjonktival kanamalar ve deri yaralanmaları sonrası durmayan kanamalar hastalığın erken bulgularından olup tanı anında hastaların yaklaşık

yarısında bulunmaktadır. Daha nadir olarak gastrointestinal, genitoüriner, bronkopulmoner veya santral sinir sistemi kanamaları başlangıç bulgusu olabilmektedir.

Akut myeloid lösemi hastalarında ALL hastalarının aksine kemik ağrıları sık olmamakla beraber, bazı hastalar (<%20) sternumda daha nadiren de alt ekstremitelerde, lösemik süreçte medüller kavitenin genişlemesine bağlı şiddetli ağrılar, rahatsızlık hissi ve/veya hassasiyet hissedebilmektedirler. Lösemik cilt infiltrasyonları (lösemi kutis veya myeloid sarkom) hastalığın seyri boyunca hastaların %13'ünde meydana gelmekte ve sıklıkla AML-M4 ve M5 alt tiplerinde görülmektedir (29).

Minör kesi ve yaralanmalar sonrası ortaya çıkan püstüller ve minör piyojenik infeksiyonlar oldukça sık olarak izlenmektedir. Sinüzit, pnömoni, pyelonefrit ve menenjit gibi majör infeksiyonlar başlangıç bulguları olarak daha az görülmekte ve sıklıkla kemoterapi sonrası mutlak nötrofil sayısı <500/mm³ olduğunda ortaya çıkmaktadır. Kemoterapi sonrası nötropenin uzamasına bağlı olarak majör bakteriyel, fungal ve viral infeksiyonlar izlenmektedir. AML hastalarında ateş, büyük çoğunlukla nötropeniyle ilişkili infeksiyonlara bağlı gelişmektedir. Bununla birlikte AML-M3'te daha sık olmak üzere AML hastalarının az bir kısmında lösemiye bağlı ateş görülebilmektedir.

Tanı sırasında hepatomegali ve splenomegali AML olgularının yaklaşık 1/3'ünde görülmektedir. Lenfadenopati monositik alt tipler dışında oldukça nadir olarak izlenmektedir. Organ tutulumunun en sık izlendiği alt tipler AML-M4 ve M5 vakaları olup, AML-M3 başta olmak üzere AML-M4 ve M5'te DİK'e eğilim, ayrıca AML-M4 ve M5'te SSS tutulum bulguları ve dişeti hipertrofisi görülebilmektedir. AML hastalarında SSS tutulum sıklığı, tanı sırasında SSS semptom ve bulgusu olmayanlarda rutin değerlendirilme önerilmediği için tam olarak bilinmemektedir. SSS tutulumu; AML-M4 ve M5, hiperlökositoz ve 2 yaş altında daha yaygın olarak izlenmektedir. SSS tutulumunda hastalar asemptomatik olabileceği gibi kranial sinir felçleri, baş ağrısı ve görme bozuklukları saptanabilmektedir. İntrakraniyal kitleler inv(16) ile ilişkili FAB M4Eo'de rapor edilmiş olup nadiren lösemik menenjitler ile bir arada görülebilmektedir. AML ile ilişkili Sweet sendromu (nötrofilik dermatoz) ve piyoderma gangrenosum gibi benign seyirli cilt lezyonları da görülebilmektedir. Bu lezyonlar ağrılıdır ve genellikle steroide cevap verirler. Obstrüktif sarılık

granülositik sarkoma sekonder olarak gelişebilmekte ve nadiren hepatik yetmezlik görülmektedir. Daha nadir olarak da priapizm, hidronefroz ve böbrek yetmezliği gibi klinik tablolar gelişebilmektedir (30-34).

2.1.5. Laboratuvar Bulguları

2.1.5.1. Periferik Kan Bulguları

Akut myeloid lösemi hastalarında kemik iliğinde üretimin azalması ve eritrositlerin yaşam süresinin kılmasına bağı olarak anemi gelişebilmektedir. Anemi genellikle normokrom normositer olup değışik büyüklükte ve şekilde eritrositlerin yanı sıra eritrosit öncülleri de periferde görülebilmektedir. Retikülosit sayısı normal ya da azalmış olarak izlenmektedir.

Akut myeloid lösemi hastalarında yetersiz üretim ve trombositlerin yaşam sürelerinin kılmasına bağı olarak genellikle trombositopeni bulunabilmektedir. Tanı sırasında hastaların yaklaşık %75'inde trombosit sayısı 100.000/mm³'ün, yaklaşık %25'inde ise 25.000/mm³'ün altındadır. Ayrıca trombositlerde morfolojik ve fonksiyon bozuklukları da görülebilmektedir. Bazen de trombositopeni DİK ile ilişkili olabilmektedir. DİK tablosu tanı sırasında (sıklıkla AML-M3'te) veya indüksiyon tedavisi sırasında görülebilmektedir. DİK hipofibrinojenemi, artmış D-dimer, koagülasyon faktör eksiklikleri (özellikle faktör V ve VIII), PT ve aPTT uzaması, sızıntı tarzı kanama ve trombositopeni ile seyredabilmektedir (35, 36).

Akut myeloid lösemi hastalarında lökosit sayısı değışkenlik göstermektedir. Tanı sırasında ortalama lökosit sayısı 15.000/mm³ olup hastaların %20'sinden azında tanı sırasında hiperlökositoz mevcuttur ve lökosit sayısı 100.000/mm³'ün üzerinde olabilmektedir. Bununla birlikte hastaların önemli bir kısmında (%25-40) lökosit sayısı tanı sırasında 5000/mm³'ün altında izlenmektedir. Bazı olgularda ise mutlak nötrofil sayısı 1.000/mm³'ten daha az bulunmaktadır. Blastlarda AML alt tipine bağı MPO, SBB ve LAP aktivitesi değışkenlik göstermektedir. AML hastalarının büyük çoğunluğunda (%95) periferik yaymada blast tespit edilebilmektedir. Blastlar periferik yaymada kolayca tanınabilmekte ancak bazen myelodisplazik değışikler gözlenebilmektedir. AML'de blastların boyutları ve sitoplazmik granül sayısı değışken olup nükleusları düzensiz olarak izlenmektedir. Blast sitoplazmasında

azurofilik granüllerden oluşan ve myeloblastlar için patognomik olan auer rod görülme sıklığı AML alt tipine göre değişebilmektedir (37, 38).

2.1.5.2. Kemik İliği Bulguları

Akut myeloid lösemi tanısında kemik iliği aspirasyonu ve biyopsi değerlendirmesi oldukça önemlidir. Kemik iliği artmış blastik infiltrasyon nedeni ile genel olarak hipersellülerdir ve biyopside monoton lösemik blast infiltrasyonu saptanmaktadır. AML alt tiplerinde kemik iliğinde saptanabilen blastları; myeloblast, monoblast, promonosit, anormal promyelosit, pronormoblast ve megakaryoblastlar oluşturmaktadır. Kemik iliği örneğinin AML olarak değerlendirilebilmesi için blast oranının %20'nin üzerinde olması gerekmektedir.

Bununla birlikte t(15;17), t(8;21), inv(16) veya t(16;16) varlığında blast sayısı %20'nin altında olsa da AML tanısı konulabilmektedir. AML'de blastlar MPO, SBB ve NSE gibi histokimyasal boyalarla değişik oranlarda pozitif reaksiyon verirler. Kemik iliği fibrozisi AML'nin tüm alt tiplerinde değişik oranlarda olup özellikle megakaryoblastik lösemide daha belirgin olarak izlenmektedir (39).

2.1.5.3. Sitogenetik Bulgular

Akut myeloid lösemi hastalarında prognoz ile ilişkili en önemli parametre sitogenetik özelliklerdir (Tablo 3). Yeni tanı erişkin AML hastalarının yaklaşık %55'inde kromozom anomalileri tespit edilebilmektedir (40, 41). WHO sınıflamasında AML için "tekrarlayan genetik bozukluklarla seyreden AML" alt başlığı altında t(8;21), inv(16), t(16;16), t(15;17), t(9;11), t(6;9), inv(3), t(3;3), t(1;22) ve 11q23 yer almaktadır (27).

Tablo 3. AML Hastalarında Sitogenetik Risk Değerlendirmesi

Risk Durumu	Sitogenetik
İyi Risk Grubu	t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13.q22) t(16;16)(p13.q22) t(15;17) Normal sitogenetikli olgularda FLT3 yokluğunda NPM1 Mutasyonu veya CEBPA mutasyonu olan olgular
Orta Risk Grubu	Normal sitogenetik +8 t(9;11)(p22q23) inv (16), t(16;16) veya t (8;21) olup c-KIT mutasyonu olanlar Normal sitogenetik olup NPM1 yokluğunda FLT3-ITD mutasyonu Diğer tanımlanamayanlar
Kötü Risk Grubu	Kompleks karyotip (≥ 3 anomali) -5, 5q- -7, 7q- 11q23 non t(9;11) inv(3)(q21q26.2) t(3;3)(q21q26.2) t(6;9) t(9;22)

Akut myeloid lösemi düşünülen hastalarda tanı sırasında sitogenetik anomalilerin tespit edilmesi hem sınıflandırmada hem de tedavi yönetiminde son derece önemlidir. Erişkin AML hastalarında t(8;21) varlığı iyi prognozla ilişkilidir. AML hastalarının %7'sinde t(8;21)(q22;q22) translokasyonu tespit edilirken, bu oran AML-M2 vakalarında yaklaşık %40 olarak bildirilmektedir (42-44). Yeni tanı AML hastalarının yaklaşık %7'sinde inv(16)(p13.1q22) veya t(16;16)(p13.1q22) tespit edilmektedir. Bu sitogenetik anomali genç hastalarda görülür ve iyi prognoz ile ilişkilidir. AML hastalarında iyi prognozla ilişkili diğer bir translokasyon AML-M3 için oldukça spesifik olan ve olguların ortalama %13'ünde saptanan t(15;17)(q22;q12)'dir (40). İntermediate prognoz ile ilişkili olan t(9;11)(p22;q23) monositik AML'de görülür ve çocuklarda daha yaygın olarak izlenmektedir. Bu translokasyonda DİK, yüksek lökosit sayısı ve diş eti veya cilt tutulumu görülebilmektedir. AML hastalarının yaklaşık %1'inde tanı sırasında t(6;9)(p23;q34) görülür ve bu translokasyon saptanan AML olgularında bazofili, pansitopeni ve displazi tipiktir. Diğer bir translokasyon olan inv(3)(q21q26.2) veya

t(3;3)(q21;q26.2) yeni tanı AML ve tedaviyle ilişkili MDS/AML olgularının yaklaşık %1'inde saptanmaktadır. Daha nadir olarak (%0.5) yeni tanı AML olgularında t(1;22)(p13;q13) görülmektedir. Kötü prognoz ile ilişkili olan 11q13 infant AML'lerin %60'ında bulunmaktadır. Ayrıca 11q13 yeni tanı genç erişkin AML hastalarında %6, çocuk AML hastalarında ise %12 oranında saptanmaktadır (42-47). AML hastalarında bu anomalilerin dışında -5/del(5q), -7/del(7q), +8, +9, +11, del(11q), -18, +19, del(20q), +21, X veya Y kromozomu yokluğu gibi sitogenetik anomaliler de saptanabilmektedir (48-52). FAB alt tiplerinde görülen anomaliler ve translokasyonlar ile bunların karşılığı moleküler değişiklikler Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4. AML'de Morfolojik Tipleme ve Genetik Değişimler Arasındaki İlişki

FAB alt tipi	Sitogenetik değişim	Moleküler değişim
M0, M1	t(10;11)	CALM-AF10
M1	Trizomi 21	MLL duplikasyonu
M2	t(8;21)	RUNX1-RUNX1T1
M3	t(15;17)	PML-RARA
M4Eo	inv(16)	CBFB-MYH11
M4	t(8;16)	MOZ-CBP
M5	11q23 translokasyonları	MLL
M5	t(9;11)	MLLT3-MLL
M6	t(3;5)	NPM-MLP1
M1, M2, M4	t(6;9)	DEK-NUP214
M2, M4	t(7;11)	NUP98-HOXA9
M7	t(1;22)	RBM15-MKL1

2.1.5.4. Biyokimyasal bulgular

Serum ürik asit düzeyi AML vakalarının yaklaşık yarısında yüksektir. İdrarda ürik asit atılımı hemen hemen her vakada artmıştır. Lökositoz ile seyreden AML hastalarında gerekli önlemler alınmadığında ürik asit nefropatisi gelişebilmektedir. Ürat nefropatisine bağlı olarak kan üre azotu ve kreatinin artışı görülebilmektedir. Tanı sırasında yüksek LDH, hipokalemi, hiperkalsemi (nadiren hipokalsemi), hiperkalemi, laktik asidoz, hipokolesterolemi ve yalancı hipoglisemi görülebilmektedir. AML-M4 ve M5 alt tiplerinde serum ve idrarda lizozim (muramidaz) düzeyi yüksek saptanabilmektedir (53).

2.1.5.5. İmmüfenotipleme

Akut lösemilerin sınıflamasında hücre yüzey antijenleri ile reaksiyona giren monoklonal antikorlar akım sitometre kullanılarak saptanabilmektedir. Pozitiflik için antijenin blastların %20'sinden fazlasında eksprese edilmesi gerekmektedir. AML'lerin tanı ve sınıflamasında en önemli göstergeleri CD33, CD13, CD15, CD4, CD11b, CD34, CD64, CD117, HLA-DR ve cMPO (sitoplazmik myeloperoksidaz) oluşturmaktadır (Tablo 5). Bu antijenlerden CD13, CD33 ve CD117 myeloid seriye ait saptanabilenen erken belirteçlerdir. CD34 AML'de daha immatür hücrelerin göstergesi olup, blastların yaklaşık %40-65'inde CD34 ekspresyonu görülmektedir. Halen cMPO myeloid seriye ait hücrelerin en önemli belirteci olarak kabul edilmektedir. CD15 daha çok farklılaşmış granülositik lösemilerde görülürken, CD14 ise monositler tarafından eksprese edilmektedir. Eritroid antijenler glikoforin-A ve CD71 olup, megakaryositik lösemi tanısında ise CD41, CD42b ve CD61 en önemli belirteçlerdir. AML'li vakaların %90'ından fazlasında CD13, CD33; %80-90'ında HLA-DR pozitif olarak izlenmektedir. HLA-DR'nin AML-M3'te negatif olması tipiktir (54-57).

Tablo 5. AML'de İmmunolojik Fenotipler

AML alt tipi	Belirteçler
Myeloblastik	CD13, CD15, CD33, CD34, CD 117, cMPO, HLA-DR
Promyelositik	CD11, CD13, CD15, CD33
Myelomonositik	CD11, CD13, CD14, CD15, CD32, CD33, HLA-DR
Monositik	NSE, CD11c, CD14, CD64, lizozim, CD4, CD111b
Eritroblastik	Glikoforin A (CD235a)
Megakaryoblastik	CD41, CD42, CD61

2.1.6. Prognostik Faktörler

Akut myeloid lösemi hastalarında tanı sırasında ve tedavi ile ilişkili olarak klinik, morfoloji, yüzey belirteçleri, sitogenetik ve çeşitli moleküler faktörler prognostik öneme sahiptir. Bu prognostik faktörlerden önemli bir kısmı Tablo 6'da görülmektedir (58).

Tablo 6. AML’de Prognostik Faktörler

Faktör	İyi	Kötü
Klinik		
Yaş	<45 yıl	<2yıl, > 60 yıl
ECOG	0-1	>1
Lösemi	<i>De novo</i>	Sekonder
İnfeksiyon	Yok	Var
Önceden kemoterapi	Yok	Var
Lökosit	<25.000/mm ³	100.000/mm ³
Serum LDH	Normal	Yüksek
Ekstramedüller tutulum	Yok	Var
SSS tutulum	Yok	Var
Kemik iliği		
Fibrozis	Yok	Var
Remisyon için kür sayısı	Tek	Çok
Sitoredüksiyon	Hızlı	Yavaş
Morfoloji		
Auer rod	Yok	Var
Eozinofili	Yok	Var
Megaloblastik eritroidler	Yok	Var
Displastik megakaryositler	Yok	Var
FAB alt tip	M2, M3, M4	M0, M6, M7
Belirteçler		
Myeloid	CD34-, CD14-, CD13-	CD34+
HLA-DR	Negatif	Pozitif
TdT	Yok	Var
Lenfoid	CD2+	CD7+, CD56+, Bifenotipik
MDR-1	Yok	Var
Sitogenetik		
Anomaliler	t(8;21), t(15;17), inv(16)	-7, del(7q), -5,del(5q), 3q21, 3q26, t(9;21), Kompleks karyotip
Moleküler markerlar		
FLT3 mutasyonları	Yok	Var
VEGF ekspresyonu	Yok	Var

2.1.7. Tedavi

Akut myeloid lösemi hastalarında uzun süreli hastalısız sağkalım elde etmenin şartı tam remisyonun sağlanmasıdır. Altmış yaş altındaki AML hastalarında

tedavi “remisyon indüksiyon tedavisi” ve sağlanan remisyonun sürdürülebilmesi için “remisyon sonrası tedaviler” olarak iki aşamadan oluşmaktadır.

Remisyon İndüksiyon Tedavisi: AML hastalarında remisyon indüksiyon (RI) tedavisi birden fazla ilaçla yapılmaktadır. Remisyon indüksiyonda hedef, kemik iliğindeki lösemi hücrelerini (10^{12} adet) morfolojik olarak saptanamayacak düzeye (10^9 adet) indirmek ve normal hematopoezi sağlamaktır. Günümüzde standart remisyon indüksiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar sitozin arabinozid (ara-C) ve antrasiklinden oluşan “3+7” kemoterapi rejimidir. Remisyon indüksiyon tedavisinde antrasiklin olarak daunorubisinin yerine diğer antrasiklinler olan idarubisin veya mitoxantron da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tedavi ile 60 yaş altı AML hastalarının %60-80’inde tam remisyon sağlanırken yaşlı hastaların ancak %50’sinde tam remisyon elde edilebilmektedir (59-61).

AML hastalarında tam remisyon, mutlak nötrofil sayısı $>1000/\text{mm}^3$, trombosit sayısı $>100.000/\text{mm}^3$ ve kemik iliğindeki blast oranı %5’in altında olması şeklinde tanımlanmaktadır. Ayrıca tam remisyonunda ekstramedüller hastalık olmaması, blastlarda auer rod olmaması ve hastanın eritrosit transfüzyonundan bağımsız olması gereklidir. AML hastalarında birinci indüksiyon tedavisiyle tam remisyon sağlanamayan hastalara ikinci kez aynı indüksiyon tedavisi uygulanmaktadır. Remisyon indüksiyon sonrası tam remisyonun geç sağlandığı hastalarda hem hastalısız sağkalım süresi hem de tam remisyon oranı daha düşük olmaktadır (62).

Remisyon Sonrası Tedavi: Tam remisyon sağlanan hastalarda remisyon sonrası tedavi seçeneklerini konsolidasyon kemoterapisi, olog kemik iliği nakli ya da allojeneik kemik iliği nakli oluşturmaktadır. Tam remisyon sonrası tedavi planı prognostik faktörlere bakılarak yapılır ve en önemli prognostik faktör hastanın sitogenetik özellikleridir.

Tam remisyon elde edilen iyi sitogenetik risk grubundaki hastalara yüksek doz ara-C (YDAC) 3-4 siklus uygulaması standart uygulamadır. İyi risk grubundaki AML hastalarında olog veya allojeneik kemik iliği transplantasyonunun kemoterapiye üstünlüğü gösterilememiştir. Orta risk sitogenetik grubundaki hastalara ise HLA tam uyumlu kardeş vericisi olan olgularda allojeneik kemik iliği nakli uygun bir tedavi seçimidir. Bu hastaların uygun vericisi yoksa 1-2 siklus YDAC sonrası olog kök hücre transplantasyonu veya 3-4 siklus YDAC uygulaması diğer

tedavi seçenekleri arasındadır. Kötü risk sitogenetik grubundaki AML hastalarına ise HLA uyumlu kardeş vericiden veya akraba dışı donörden allojeneik kök hücre nakli önerilen tedavidir. Allojeneik kök hücre nakli şansı olmayan hastalar 1-2 siklus YDAC sonrası otolog kemik iliği nakli ya da klinik araştırma protokollerine yönlendirilmelidirler (63-66).

Yeni tanı 60 yaş üzeri AML hastalarına komorbidite, sitogenetik, yaş ve performans gibi parametrelere göre standart “3+7” ya da “2+5” tedavisi, azasitidin, desitabin, subkutan sitarabin, klofarabin veya çalışma protokolüne dahil edilme gibi değişik seçenekler uygulanabilmektedir (67). AML-M3 hastalarında induksiyon tedavisinde ATRA (all trans retinoik asit) ve sitarabin veya ATRA ve idarubicin kombinasyonları kullanılabilir. Konsolidasyon tedavisinde ATRA’nın dahil edildiği değişik kombine kemoterapi tedavileri uygulanabilmektedir (68).

2.1.8. Relaps ve Dirençli AML Tedavisi

Son on yılda tedavideki gelişmeleri takiben AML’de remisyon oranları %60-80’e, 5 yıllık yaşam süreleri %40’ların üzerine çıkmıştır (69). Bu düzelmede hasta riskinin belirlenerek uygun tedavi rejimlerinin seçilmesi ve yoğun kemoterapi programlarının iyi bir destek tedavi ile birlikte olmasının rolü büyük olmuştur. Komplet remisyon (CR) giren olguların %50’sinin relaps yapması, bu relapsın da %60’ının ilk 1 yılda karşımıza çıkması ve ilk tedavilerinde remisyon girmeyen olguların varlığı önemli bir sorundur. Çünkü bu hastaların bugün için 2 yıllık yaşam süreleri %20 dolaylarındadır (2).

2.1.8.1. Relaps ve Tedavi Direncinde Rol Oynayan Faktörler

Günümüzde tedavi direnci ve relapsta rol oynadığı düşünülen en önemli faktörlerin başında MDR yer almakta olup; özellikleMDR1 geninin kodladığı bir eflüks pompa proteini olan P-gp, MRP, LRP ve BCRP hücre içine giren ilaçların dışarıya hızla atıldığı bir ortam yaratmaktadır. Ayrıca topoizomera ve glutatyon sentetaz enzim aktivitelerinde, apoptozis direnç genlerinden özellikle bcl-2 gen aktivitesindeki artış lösemik hücrelerde sitotoksiteye karşı direnci artırmaktadır.

Özellikle P-glikoprotein relaps yapan lösemilerde en önemli sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (7).

2.1.8.2. Dirençli ve Relaps AML Olgularında Tedavi

Dirençli ve relaps yapmış olgularda optimum tedaviden bahsetmek mümkün görünmemektedir. Bu hastalarda uygulanacak olan kurtarma rejimleri ile %30-70 oranında 2. tam yanıt sağlansa da remisyon genellikle kısa süreli olmakta ve nadiren küratif olabilmektedir. Bu nedenle allojeneik kök hücre nakli hastalıksız yaşam süresini uzatacak veya kür yaratabilecek tek tedavi seçeneği olarak görülmektedir. Bu hastaların mevcut tedavi rejimleri ile iki yıllık yaşam oranı %20 dolaylarında olup, 2 yıllık en yüksek yaşam süresi çocuklarda %35 ve iyi risk grubundaki çoğu genç olgularda %38 oranındadır (69, 70).

Relaps yapan olgularda tedavi 2. tam yanıt sağlanması ve takiben kök hücre nakli ile sonlanan konsolidasyon rejimleri olmak üzere iki kısımda planlanmaktadır.

Reindüksiyon tedavileri: İkinci remisyonun sağlanması için standart bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda tam remisyon süresinin bir senenin altında olan olgularda ilk remisyonu indüklemek için kullanılan rejimin reindüksiyon için kullanılması halinde yanıt olasılığının %1'in altında olduğu gösterilmiştir. Relaps ve refrakter AML olgularında son yıllarda uygulanan rejimler incelendiğinde ise protokollerin çoğunun YDAC içerdiği görülmektedir. Ancak tek başına uygulanan YDAC rejimleri sadece %20 oranında tam yanıt sağlarken bu rejimlere antrasiklin eklendiğinde, bu oranın %50'lerin üzerine yükseldiği görülmektedir. Ancak relaps süresi 1 senenin altında olan olgularda ve özellikle primer refrakter hastalarda YDAC içeren rejimlerin tam yanıt oranları belirgin olarak düşük olmakta ve ortalama %30 oranında kalmaktadır (71, 72). Takiben fludarabin içeren rejimlerin relaps olgularda ara-C ile birlikte kullanımıyla oldukça iyi sonuçlar rapor edilmiştir. FLAG [fludarabin, ara-C, G-CSF (granülosit koloni stimulan faktör)] rejimi bu amaçla kullanılan en yaygın kombinasyon olup erişkinlerde ortalama %60-80, çocuklarda %80 oranında 2. tam yanıt sağlanabilmektedir. Ancak bu rejimde en önemli sorunu erken relapsta ve primer refrakter olgularda başarısının %30'lara ve 12 aylık yaşam oranlarının %20'lere düşmesidir. FLAG, antraksilin kombinasyonlarında ise kardiyak toksitesi daha az olan mitoxantron ve

idarubisin tercih edilirken, özellikle de idarubisinin MDR dirençli antrasiklin olması ve daunorubisine göre tam yanıt ve yaşam süresine daha olumlu etkilerinin gösterilmiş olması nedeniyle FLAG-idarubisin kombinasyonu en sık kullanılan rejim olmuştur (73-79). Bir diğer rejim EMA (etoposid, mitoxantron, ara-C) ile de benzer sonuçlar alınabildiği, toksisite açısından bir fark taşımadığı belirtilmektedir. Bir diğer reindüksiyon rejimi olan ADE (ara-C, daunorubisin, etoposid) protokolü ile de tam yanıt oranlarının iyi olduğu MRC AML-R çalışmasında gösterilmiştir. Bir diğer kombinasyon da YDAC-mitoxantron rejimi olup yapılan bir araştırmada tek başına YDAC rejimi ile sonuçları karşılaştırılmış olup tam yanıt oranlarının daha iyi olabileceği belirtilmiştir (80-82).

Relaps yapmış akut promyelositik lösemi olgularında ise ATRA ile reindüksiyon tedavisiyle yüksek oranda tam yanıt elde edilmesi mümkün ise de ilk indüksiyon tedavisinde kullanılan ATRA-idarubisin kombinasyonu reindüksiyon için kullanılabilir. Ancak relaps, refrakter olgularda arsenik trioxide (ATO) uygun bir tedavi yaklaşımıdır. Daha önce ATRA tedavisi alan relaps-refrakter olgularda ATO ile %52-92 oranlarında tam yanıt sağlanabildiği, tekrarlanan kürlerinde ise PML-RARA füzyon transkriptini negatifleştirdiği rapor edilmiştir (83).

Konsolidasyon Tedavisi: Allojeneik veya otolog transplantasyon ile sonlanan iki veya üç kürlük konsolidasyon tedavisi uygulanmaktadır. Uygulanan kürlerin sayısı hastanın yaşı ve performans durumuna göre belirlenmekte ve konsolidasyon kürleri de reindüksiyon için kullanılan rejim ile yapılmaktadır. Kök hücre transplantasyonunda ise en çok tercih edilen relaps oranının daha düşük olması nedeniyle allojeneik transplantasyon olup, allojeneik transplantasyon için yüksek mortalite riski taşıyan veya donörü olmayanlarda otolog transplantasyon önerilmektedir. Relaps, refrakter AML olgularında allojeneik transplantasyon sonrası donör lenfosit infüzyon uygulaması ile kısmi remisyon durumlarında %20 oranında tam remisyon sağlanabilmektedir (83).

2.1.9. Refrakter ve Relaps AML'de Devam Eden Çalışmalar

Yukarıda tartışılan kemoterapilerin hâlâ tam remisyon oranları ve hastalıksız sağkalım üzerine etkisinin kısıtlı olması yeni tedavileri gündeme getirmiştir (tablo 7) (83).

Tablo 7. AML Tedavisindeki Yeni İlaçların Hedefleri

Hedef	İlaç
CD33	Myelotarg (GO), Hum195
CD45	I131 ile kombine
MDR/P-glikoprotein	Siklosporin-A, PSC833
Anjiogenezis	Talidomid, SU5416
Hipermetilasyon	Azasitidin, Desitabin
Histon deasetilaz	Fenilbutirat, Desipeptid
Bcl-2	Bcl-2 antisense
S-faz	UCN01
20S proteozom	PS-341
Tirozin kinaz	STI-571
Farnezil transferaz	RH115777, BMS214662

Yeni tedavi yöntemleri;

- Çoklu ilaç direncinin (MDR) yenilmesi
- Yeni sitostatiklerin gelişimi
- Eski ilaçların yeniden kombinasyonlara girmesi veya yeni formülasyonları
- Tümör spesifik moleküler hedeflere yönelik ilaçlar
- Antianjiogenezis
- Lösemi hücre yüzeyine spesifik ajanların tedaviye girmesi
- İmmünoterapi'yi içermektedir.

Çoklu ilaç direncini etkileyen ilaçlar: Çoklu ilaç direnci AML tedavisinin majör ilaçları olan YDAC ve antrasiklinlere dirençten sorumludur. Bu alanda kullanıma sunulan iki ajan söz konusu olup bir tanesi siklosporin-A (CsA), diğeri PSC833 (Valdospar)'dır. Valdospar bu alanda kullanıma sunulan ilk ilaç olup CsA'dan farklı olarak ilaçların hepatik metabolizmasını etkilememektedir. Valdospar'ın 60 yaşın üzerindeki hastalarda ara-C, daunorubisin, etoposid kombinasyonuna eklendiği CALGB çalışmasında toksisite nedeniyle çalışma sonlandırılmıştır (86). Ancak 60 yaş altı relaps, refrakter olgularda EMA rejiminin etkinliğini artırabileceği rapor edilmiştir (87). Alan F ve ark. tarafından yayınlanan SWOG çalışmasında 226 hasta randomize edilerek, YDAC-daunorubisin kombinasyonuna daunorubisinin uygulandığı 6-8. günlerde CsA uygulanmış ve tam

yanıt oranlarında %16'lık bir artış sağlarken bunun anlamlı olmadığı, ancak kemoterapi direncinin %47'den %31'e düştüğü, hastaliksız yaşam süresi ve genel yaşam süresinin anlamlı olarak arttığı rapor edilmiştir (88). Bir başka çalışmada 18 relaps, refrakter olguda sıralı YDAC-idarubisin kombinasyonuna CsA eklendiğinde tam yanıt oranlarının %61 gibi yüksek rakamlarda olduğu ve bu etkinliğin CsA'ya bağlı olabileceği rapor edilmiştir (89). Ancak 213 relaps, refrakter olguda yapılan MRC AML-R çalışmasında ADE tedavisine CsA eklendiğinde CsA'nın beklenen etkinliği göstermediği CsA alan ve almayan olgular arasında fark olmadığı rapor edilmiştir (80). Bu alanda CsA ve valdospardan farklı LY-335979, VX710, VX853 gibi yeni ilaçlar da üretilmiş olup çalışmalar devam etmektedir (85).

2.2. Propolis ve CAPE

2.2.1. Propolis

Arıların çeşitli bitkilerden topladığı özütlerle reçinemsı bir madde haline getirdiği propolis, arılar tarafından kovanların onarılmasında ve dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır. Halk arasında ve alternatif tıpta ise pek çok hastalığın tedavi edilmesinde kullanılan propolis, 1950'li yıllardan bu yana bilim çevrelerince de ilgilenilen bir maddedir. Ham propolisin kompozisyonu, genel olarak %50 reçine ve bitkisel balsam, %30 balmumu, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır. Kimyasal yapısını ise aminoasitler, fenolik asitler, fenolik asit esterler ve flavonoidler, sinamik asit, kumarik asit, terpenler, hesperatin, nikotinik asit, kafeik asit ve kafeik asit fenetil ester (CAPE) oluşturmaktadır. Bu maddelerin analjezik, antiinflamatuar, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan ve antitümöral etkileri gösterilmiştir (90-95).

2.2.2. CAPE

Kafeik asit fenetil ester (CAPE); propolis içeriğinde bulunan ve propolisten izole edilen çok geniş spektrumlu etkileri bulunan bir maddedir. Fenolik bir bileşik olan CAPE, propolisin biyolojik olarak aktif bileşenlerinden biri olmakla birlikte antioksidan, antiinflamatuar, antiviral, immün uyarıcı, karsinostatik ve antikanser

özellikleri bulunan bir bileşiktir (6,7). Çok uzun aromatik ve alifatik yapıda karbon grupları taşıdığı için aynı zamanda lipofilik özelliktedir. Böylelikle, hücre membranından kolayca geçmesi mümkün olmaktadır (96).

2.2.3. Propolis ve CAPE'in Antitümöral Etkileri

Propolisin tümör hücreleri üzerindeki antiproliferatif, antiklonal ve apoptotik etkileri in vitro ve in vivo olmak üzere pek çok çalışmada gösterilmiştir (97). HCT-116 (kolorektal kanser hücre serisi) ile in vivo tümör oluşturulan farelerde, propolisin oral yolla alınmasının toksisite oluşturmadığı ve tümör kitlesindeki mitotik hücre oranının azaldığı gösterilmiştir (98). Skuamöz hücreli baş ve boyun kanseri hücre hatlarında propolisin antitümöral etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise, propolisin doz ve zamana bağımlı olarak proliferasyonu ve klonaliteyi baskıladığı ve apoptoza yol açtığı izlenmiş; 3 hücre hattından 1'inde propolisin radyoterapiye karşı duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (99). Propolis ekstraktlarının spesifik olarak apoptoza yol açtığı gösterilen bir diğer çalışmada ise, MCF-7 (meme kanseri hücre serisi) hücrelerinde, propolisin apoptotik etkisinin endoplazmik retikulum stresi ve kaspaz sinyalizasyonunun indüklenmesi ile gerçekleştiği gösterilmiştir (100). Bu durum, propolisin kanser hücrelerinde yol açtığı ölümün toksik olarak değil, fizyolojik bir ölüm şeklinde gerçekleştiğini göstermektedir.

Yapılan pek çok araştırma; CAPE'in tümör hücreleri üzerindeki öldürücü etkisinin sitotoksik olarak değil; apoptozu indükleyerek, fizyolojik bir şekilde gerçekleştiğini göstermekle beraber, CAPE'in selektif apoptotik etkisinin moleküler mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır. CAPE'in proliferasyonu indükleyen ve pek çok kanserde overeksprese olduğu bilinen NFkB'yi inhibe ettiği bildirilmiştir. CAPE'in, tümör hücrelerinde kemoterapi ve radyoterapiye karşı hassasiyet oluşturarak, tedavinin etkinliğini artırdığı, bunun yanında CAPE'in kanser hücreleri üzerinde seçici antitümöral etkiler gösterdiği de literatürde yer almaktadır (101-109).

Kanser kök hücreleri ile yapılan çalışmada, CAPE muamelesine yanıt olarak meme kanseri kök hücrelerinin klonalite yeteneğini kaybettiği gözlenmiştir. Apoptotik etkinin gözlenmemiş olması, kök hücrelerin kimyasal ajanlara direnciyle ilişkilendirilmiştir. Ancak CAPE ile G0'daki hücrelerin döngüye devam ederek

farklılaşması indüklenmiş ve hücrelerin kimyasal ajanlara hassasiyeti arttırılmıştır. Ayrıca bir çalışmada CAPE'in MDA-231 meme kanseri hücre serisinden izole edilen kanser kök hücreleri üzerine etkili inhibisyon yaptığı gösterilmiştir (110).

2.2.4. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Hücre proliferasyonu hücre döngüsü içinde yer alan bazı kontrol noktaları tarafından düzenli olarak kontrol edilmektedir. Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre döngüsünün aktif (G1, G2, S ve M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı denilen G0 fazında beklerler. Hücre bölünme uyarısı aldığıında sinyal ileti kaskadı aracılı mekanizma (örneğin, MAP kinaz, Protein Kinaz C veya JAK/STAT yolları) devreye girer. Böylece, hücre sıklusa sokularak bölünmeye (mitoza) sevk edilmiş olmaktadır. Hücreler mitoza girmeden önce bir hazırlık safhası geçirirler ve bu safhada hücreler hacimce büyürler. Bu hazırlık safhasında bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler (siklin'ler) ve makromoleküller (deoksiribonükleik asit) sentezlenir. Bu hazırlık safhasına interfaz denilmektedir. İnterfaz kendi içinde G1, S ve G2 olmak üzere çeşitli alt basamaklardan oluşmaktadır. Genel olarak, G1 fazı DNA sentezine (S fazına) ve G2 fazı ise mitozise (M fazına) hazırlık safhalarıdır. Bu fazlarda RNA, protein sentezleri yapılmakta ve hücre kendisini bölünme için yeniden organize etmektedir. G1 ve G2 kısaltmaları "gap" boşluk sözcüğünden gelmektedir. S ise DNA sentezi fazını gösterir. G0 fazı ise normalde hücre döngüsü içinde yer almayan ve döngüsünü tamamladıktan sonra sıklusdan çıkan hücrelerin bulunduğu fazdır. Hücre döngüsü sıklusa özgü birtakım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilmektedir. Siklin, CDK ve CDI düzeyleri hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında farklılık göstermekte ve oldukça karmaşık olarak hücre döngüsünün ilerlemesi düzenlenmektedir. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak, siklin'e bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Siklinler bu komplekslerin regülatör subüniteleri, CDK'lar ise katalitik subüniteleridir. Siklinler (A, B1, D ve E) hücre döngüsünün

çeşitli fazlarında periyodik olarak sentez edilirlerken aynı zamanda da yıkılırlar. Bu yüzden de siklinler olarak isimlendirilmişlerdir. Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, dolayısıyla ilişkide buldukları CDK'ların (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25) aktivitelerinin düzenlenmesini sağlamaktadır. CDK'ların aktiviteleri sadece siklinlerle düzenlenmez, özgün fosforilasyon/defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenmektedir. CDI'ler (p15, p18, p19, p21 ve p27) ise siklinler veya CDK'lar ya da siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe ederler. Siklinlerin seviyeleri transkripsiyon düzeyinde regüle edilmekte, yıkımları ise "ubiquitin" metabolik yoluyla sağlanmaktadır. D tip (D1, 2, 3) siklinler başlama siklinleri olarak adlandırılırlar ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak eksprese edilirler. Mitojenler ortamdaki uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar. Hangi tip siklin D'nin eksprese edileceği doku tipine özgüdür. Örneğin, T lenfositler daha ziyade D3 (bir miktar da D2) tipini eksprese ederler. D tip siklinler CDK4 ve CDK6'yı regule ederler. Siklin E, G1/S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiği anda hızla yıkılmaktadır. Siklin E, CDK2'yi regule etmekte, Siklin A ve B1 ise mitotik siklinlerdir. Siklin A, S fazı boyunca sentez edilir ve anafaz sırasında yıkılır. Siklin A, CDK2 ile kompleks yapar ve bu kompleksin DNA replikasyonunda direkt rolünün olduğu düşünülmektedir. Siklin B1 ise S fazının geç döneminde sentez edilir ve G2 fazından M fazına geçerken sentezi maksimal düzeye erişir, ardından anafazda yıkılır. Siklin B, CDK2 ile etkileşime girer ve bu kompleks MPF ("M-phase/maturation promoting factor") olarak da bilinir. Siklin B'nin anafazda yıkılmasıyla birlikte hücrede mitoz sonlanır ve G1 fazına tekrar geri döner. G1 fazı, hücre döngüsünün süresi açısından en fazla değişkenlik gösteren fazıdır. Bu fazın süresi döngünün en önemli belirleyicisidir. Bu fazda hücre bölünmek, farklılaşmak veya apoptozis için karar verir ve bazı genlerde değişiklikler başlar. Örneğin, bölünecek hücrede DNA polimeraz veya nükleotid sentezinde gerekli olan dihidrofolat redüktaz gibi bazı enzimlerin genlerindeki aktivasyonları takiben bu genlerin ürünleri G1/S sınırında artmaya başlar. Bu fazda gerçekleşen değişiklikler başlıca c-fos, c-myc ve c-jun gibi transkripsiyon faktörlerinin genlerinde görülür. Bu transkripsiyon faktörleri AP1 bölgeleri olarak da bilinen regülatör DNA dizilerine bağlanırlar. Böylece, AP1 bölgelerini taşıyan genlerin aktivasyonu sonucu siklin ve CDK'ların aktivasyonları sağlanır. Bunlardan c-myc ve c-jun aynı zamanda onkojen olarak da bilinirler. Ayrıca hücre-spesifik bir

onkogen ürünü olan c-myc de hematopoetik hücrelerde bu fazda artış izlenmektedir. İnhibitör sinyalleri CKI ailesi üzerinden etki gösterirler. S fazında, hücre DNA'sını hızla replike eder. Hızlı olmasından dolayı DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması esnasında bazlar, çeşitli ilaçlar veya mutajenler gibi dış ajanların etkisine açık hale gelirler. Bu yüzden DNA sentezi bir kez başladımı hızla bitirilmelidir. G2 fazında, bir önceki (S) fazda replike olmuş DNA ve kromatin proteinleri kondanse olurlar ve "sister" kromatidler halinde paketlenirler. Tamir mekanizmalarından kaçmış hasarlı DNA veya replike olmamış DNA bu fazda kontrol edilir. M fazında, "sister" kromatidler düzgün bir şekilde bir hizaya gelirler ve ardından çeşitli aşamalardan geçilerek hücre ikiye bölünür (111-113).

2.2.5. Epigenetik Düzenleyici Gen Mutasyonları

Genlerin ne zaman, nerede ve ne kadar çalışacağını belirleyen ve DNA'nın yapısında veya diziliminde herhangi bir değişiklik olmaksızın genetik bilginin farklı şekilde açığa çıkması epigenetik düzenleyici mekanizmalar tarafından sağlanmaktadır. Epigenetik mekanizmalar içerisinde DNA düzeyindeki modifikasyonların en bilinen ve en işlevsel olanı DNA metilasyonudur. Bu grupta en sık karşılaşılan mutasyon da TET2 mutasyonudur (115-117).

2.2.5.1. TET2 Gen Ekspresyonu

TET gen ailesi TET1, TET2 ve TET3 olmak üzere üç farklı yapıdan oluşmaktadır. TET2 metilsitozine hidroksil eklenmesini sağlayan 2-oksoglutarat ve Fe (II)-bağımlı hidroksilaz enzimlerini kodlayan bir gen dizisidir. TET2 proteinini kodlayan gen kromozom 4q24'te yer alır. 134 kb boyutunda 9 ekzondan oluşur ve TET2 proteinlerini kodlar. Ana TET2 proteini 2002 aminoasitlik bir zincirden oluşmaktadır (115).

TET2 böbrek, beyin ve hematopoietik hücrelerde yaygın olarak bulunmaktadır. TET2 geni CD34+ hematopoietik kök hücrelerde, CD14+ monositlerde, granüositlerde, eritrositlerde ve CD3+ T hücrelerinde tespit edilmiştir. TET2'nin izoform 1 ve enzimatik reaksiyondan sorumlu C-terminalden yoksun izoform 2 olmak üzere iki farklı izoformu mevcuttur. TET proteinleri enzimatik

süreçten sorumlu olan 2 adet C-terminal bölgeye sahiptir. TET1 farklı olarak CXXC adlı bir kısım içerir. CXXC kısmı DNA ile DNA'ya bağlanan düzenleyici proteinler arasında bir köprü görevi görmektedir. Bu CXXC proteinleri DNA metilasyonu, kromatin şekillendirmesi ve transkripsiyonun inhibisyonu gibi görevlerde yer alır. TET2 ve TET3'de CXXC kısmı bulunmamasına rağmen aynı enzimatik reaksiyonları gösterirler. Muhtemelen henüz bilinmeyen bazı yardımcı proteinlerin bu duruma katkıda bulunduğu düşünülmektedir. TET'lerin katalizör aktivitesi izositrat dehidrogenaz1(IDH1) ve izositrat dehidrogenaz 2 (IDH2) bağımlıdır. IDH1 ve IDH2 genlerindeki bozukluk TET enzimlerinin aktivitesini engellemektedir. TET enzimleri tüm hücre tiplerinde görülen modifiye bir nükleotid olan hidroksimetilsitozin (5hmC) oluşumundan sorumludurlar. Normal şartlar altında metil sitozin (5mC) molekülünün oluşması sitozin oluşumu için önemli bir epigenetik değişikliktir. 5hmC ise hedef sitozinin DNA-metiltransferaz tarafından metillenmesini önler. Birçok metil-CpG-binding proteinleri (MBD1, MBD2 ve MBD4) 5hmC'ye 5mC'den daha az bağlanırlar. 5hmC bu süreçte inhibitör rol oynamaktadır. Bu sebeple TET mutasyonları sonrası azalan 5hmC ilişkili baskılanma ortadan kalkar ve hematopoietik hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi bozulur. Dolayısıyla malign transformasyona zemin hazırlanmış olur (116-118). TET2 geni çıkarılmış (TET2 -/-) farelerde genomik 5hmC miktarının azaldığı ve değişik miyeloid malignitelerin geliştiği gösterilmiştir. İnsanlarda TET2 mutasyonları geniş bir yelpazede birçok miyeloid ve bazı lenfoid malignitelerde görülmektedir. TET2 mutasyonları MPN, MPN/MDS, MDS, AML ve sekonder AML hastalarında değişen sıklıkta görülmektedirler. Mutasyonlar genelde proteinin işlevini yitirmesine yol açan küçük insersiyon, delesyon ve anlamsız mutasyonlardan oluşmaktadır. İnsan hücrelerinde TET2 mutasyonu varlığında in vitro olarak eritroblastik değişimin olduğu gösterilmiştir (119). Bunlara ek olarak TET2 mutasyonu T hücreli ve B hücreli lenfomalarda da saptanmıştır. Bu bilgilerin ışığında TET2 için hematopoezin hem erken fazında hem de miyeloid ve lenfoid farklılaşma fazında etkisi olduğu söylenebilir. TET2 mutasyon varlığı AML hastalarında kötü prognostik faktör olarak dikkat çekmektedir. Birçok çalışmada ileri yaş, yüksek lökosit değerleri, blast sayısı ve düşük trombosit değerleri ile ilişkili bulunmuştur. AML li hastalarda %8 -23'nde TET2 mutasyonu tespit edilmektedir (120).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. K562 Hücre Dizisi

K562 hücreleri kronik miyeloid lösemnin blastik kriz evresinden kaynaklanan miyeloid seri hücre dizileridir. Normal kromozom sayısının yaklaşık 1.5 katı kromozom bulunduran bu hücreler abl/ber füzyon geni ekspresyonu nedeni ile apoptozis'e dirençlidirler. K562 lösemi hücreleri kendini yenileme özelliğinden dolayı hemopoetik pluripotent hücrelere benzerler. K562 hücreleri gen ekspresyonu, hematopoetik düzenlemenin anlaşılması için yapılan çalışmalarda oldukça kullanışlıdır (121-123).

3.1.2. Projede Kullanılan Makine, Teçhizat ve Sarf Malzemeleri Listesi

Malzeme	Projede Kullanım Amacı
Etüv Heraeus, Almanya	Hücre kültürü ve inkübasyon işlemleri
Buzdolabı Bosch, Türkiye	Kimyasalların saklanması
Derin dondurucu (-20) Bosch, Türkiye	Kimyasalların saklanması
- 80 C dondurucu Thermo Scientific, ABD	Hücre saklanması
Laminar akım Class II, Metisafe, Türkiye	Hücre kültürü
Pastör fırını Nüve, Türkiye	Sterilizasyon
PipetAid Gilson, ABD	Hücre kültürü
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj (1 adet) Eppendorf 5804, Almanya	Hücre kültürü
Otomatik pipet seti HighTech Lab, Polonya	Hücre kültürü
Çeşitli boyutlarda pipet uçları muhtelif	Hücre kültürü
İnverted mikroskop, Zeiss	Hücre kültürü
Doku kültür flaskları (T25, T75)	Hücre kültürü
Thoma lamı, Marienfeld, Almanya	Hücre sayımı
Flowsitometri BD Accuri C6 Plus BD Biosciences, Kanada	Hücre döngüsü ve hücre yüzey belirteçleri belirlenmesi
10ml enjektör, Ayset, Türkiye	Materyallerin Taşınması

3.1.3. Kimyasallar

Kimyasal Maddeler	Projede kullanım amacı
CAPE, Sigma Aldrich, C8221	Hücre döngüsü ve TET2 ekspresyonu etkisi araştırılması
Buffer RLT (220 ml) solüsyonu, QIAGEN, 79216	RNA izolasyonu
Etanol	RNA izolasyonu
Buffer RW1 (220 ml) solüsyonu QIAGEN, 1053394	RNA izolasyonu
RNase-Free Water QIAGEN, 129112	RNA izolasyonu
RPMI 1640, İNVİTROGEN, 21875-034	Hücre kültürü

3.1.4. Kitler

Kitler	Projede kullanım amacı
Cell Titer Glo® Luminescent cell viability assay	Hücre canlılığı
RNeasy Mini Kit (50), QIAGEN, 74104	RNA izolasyonu
Plate (96 kuyucuklu) Greiner, Almanya	Hücre canlılığı
QuantiTect Reverse Transcription Kit, QIAGEN, 205311	RNA'dan cDNA sentezi
QuantiTect SYBR Green PCR Kit QIAGEN, 204143	RNA'dan cDNA sentezi

3.2. Metod

3.2.1. Hücrelerin Çoğaltılması

K562 hücreleri %10 fetal bovine serum, %1 L-glutamat, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri ne ekilerek 37°C⁰ de %5 CO₂'li inkübatörde çoğaltıldı.

3.2.2. Hücre sayımı

5 ml hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılarak, pellet 3 ml besi yerinde resüspanse edildi, takiben hücre süspansiyonundan 50 mikrolitre eppendorf tüpüne alınarak 50 mikrolitre tripan mavisi ile karıştırılıp, bu karışımın 10 mikrolitresinin thoma lamında sayımı sonrası mililitredeki hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

Mililitredeki hücre sayısı= hücre sayısı x 10⁴ x 2 (dilüsyon katsayısı)

3.2.3. RNA İzolasyonu ve Reverse Transkriptaz PCR

Hücrelerden RNA izolasyonu, QIAGEN RNeasy Mini Kit protokolüne göre yapıldı. Daha önce 6 kuyucuklu pleytlere ekilmiş ve muameleli/muamelesiz olarak gruplandırılmış yaklaşık 1x10⁶ sayıdaki hücreler toplandı. Hücre pelletinin üzerine, kit içeriğindeki RLT solüsyonundan 350 µl eklenerek hücreler süspansiyon edildi ve ependorf tüplere alındı. RLT solüsyonu ile süspansiyon edilen hücrelere, 350 µl etanol eklendi ve ince şırıngalı enjektörden geçirilerek homojenize edildi. Ardından toplam hacmi 700 µl olan hücre süspansiyonu, toplama tüpüne yerleşik olan kolonlara aktarıldı ve 8000 g' de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüjün ardından toplama tüpünde biriken sıvı döküldü ve her bir kolondan 700 µl RW1 solüsyonu geçirildi. Kolonlar, 8000 g' de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı dökülerek her bir kolondan 500 µl RPE solüsyonu geçirildi. Kolonlar 8000 g' de 15 sn santrifüj edildi ve toplama tüplerindeki sıvı dökülerek 500 µl RPE solüsyonu her bir kolondan tekrar geçirildi. Kolonlar 8000 g' de 2 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpleri ve içerdikleri sıvı atılarak kolonlar temiz toplama tüplerine alındı. Kolondan herhangi bir solüsyon geçirilmeden, 14000 rpm' de 1 dk. santrifüj gerçekleştirildi. Daha sonra kolonlar, temiz ependorf tüplerin üzerine alınarak, kolonlardan 40 µl RNase-free water geçirildi. Yaklaşık 2-3 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8000g' de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonlar atılarak, RNA' nın içinde bulunduğu ependorf tüpler -20°C' de muhafaza edildi.

Hücrelerden izole edilen RNA' dan cDNA sentezi "QuantiTect Reverse Transcription Kit" ile gerçekleştirildi. Kit protokolü takip edilerek gerçekleştirilen bu işlemlerde kullanılan bileşenler ve miktarları aşağıda verilmiştir.

gDNA	Wipeout Buffer	7X 2 µl	1X
Kalıp RNA	Değişken (1µg' a kadar)		
RNase-free Water	Değişken		
Toplam Hacim	14 µl		

Karışım hazırlanarak 42°C' de 2 dk inkübe edildikten sonra buza alındı. Reverse Transkriptaz reaksiyonu için gerekli bileşenler aşağıda verildiği gibi hazırlandı.

Reverse Transkriptaz	1 µl
RT Buffer, 5X	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
Kalıp RNA	14 µl
Toplam Hacim	20 µl –

Belirtilen şekilde hazırlanan 20 µl karışım, 42°C’ de 15 dk, 95°C’ de 3 dk olmak üzere tek bir PCR döngüsü şeklinde gerçekleştirildi. PCR döngüsü tamamlandıktan sonra -20°C’ de muhafaza edildi.

3.2.4. Kantitatif Real Time PCR (Qrt-PCR)

Real Time PCR, QIAGEN QuantiTect SYBR Green PCR kit protokolüne uygun şekilde Roche Light Cycler 480 II cihazında gerçekleştirildi.

Bileşen	Hacim/Reaksiyon
1. 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µl
2. Primer 1	0.5 µl
3. Primer 2	0.5 µl
4. RNase-free su	6 µl
5. İlk denatürasyon	15 dk 95°C
6. Denatürasyon	15 sn 94°C
7. Bağlanma	30 sn 60°C
8. Uzatma	30 sn 72°C
9. Döngü Sayısı	40

TET2 mRNA ekspresyonu delta Ct metoduyla RPL0 ya karşı normalize edilerek Grafpad prism V6 programı ve student t test ile istatistiksel analizi yapıldı.

3.2.5. Akım Sitometri ile ABC Taşıyıcı Antijenlerinin Tayini

1. Hücreler konsantrasyonu 1×10^6 olacak şekilde PBS ile süspansiyon edildi.
2. Kontrol grubu ve yüzey antijenleri için iki ayrı tüp hazırlandı.
3. Kontrol tüpüne 10 µl IgG1/IgG1, 10 µl IgG1-PE kontrol konuldu.
4. ABC taşıyıcı ekspresyonu için hücrelere 20 µl CD243-PE eklendi.
5. Tüpler düşük hızda 4-5 sn vortekslenildi ve karanlıkta 20 dk inkübe edildi.

6. Akım sitometri cihazında her bir örnek için 30000 hücre sayıldı ve analizler BD Accuri C6 software de yapıldı.

3.2.6. Hücre Döngüsü Analizi

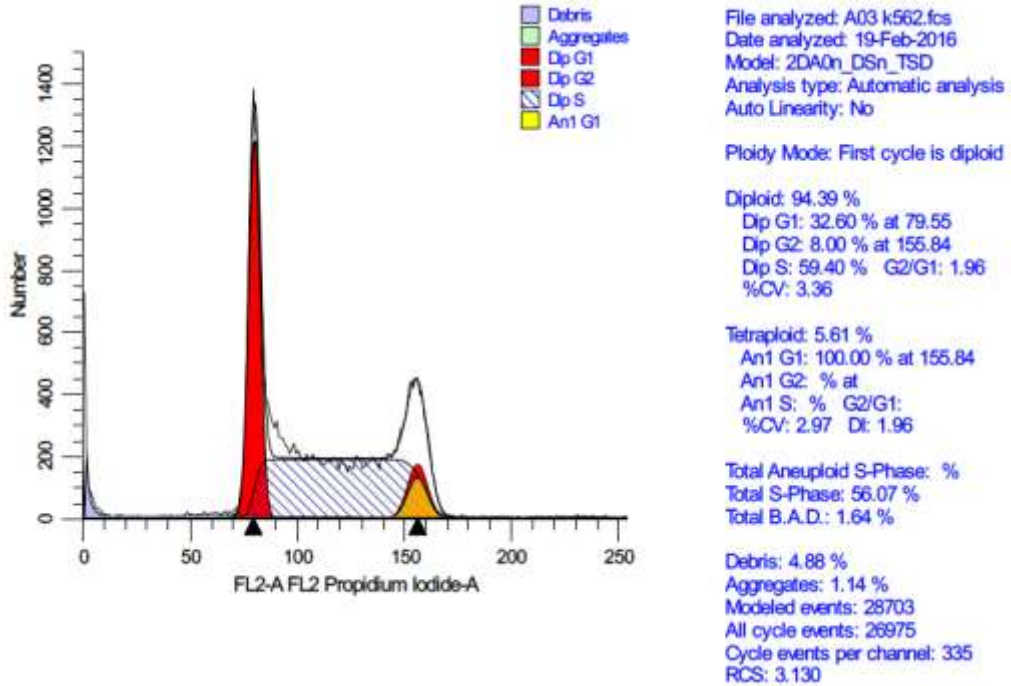
Hücrelerin CAPE muamelesi ile hücre döngüsünün hangi evresinde bulunduğu CycleTEST Plus DNA Reagent kit kullanıldı.

1. 1×10^6 hücre tampon solüsyonu ile 3 kez yıkandı
2. 300 g' de 5 dk santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı
3. 250 μ l solüsyon A eklendi ve çalkanan tüp 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi
4. 200 μ l solüsyon B eklendi ve çalkanan tüp 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi
5. 200 μ l solüsyon C eklendi ve çalkanan tüp 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi
6. İnkübasyon sonrası her bir örnekten akımsitometri cihazında 30000 hücre sayıldı ve hücrelerin DNA miktarları Modfit programında analiz edildi

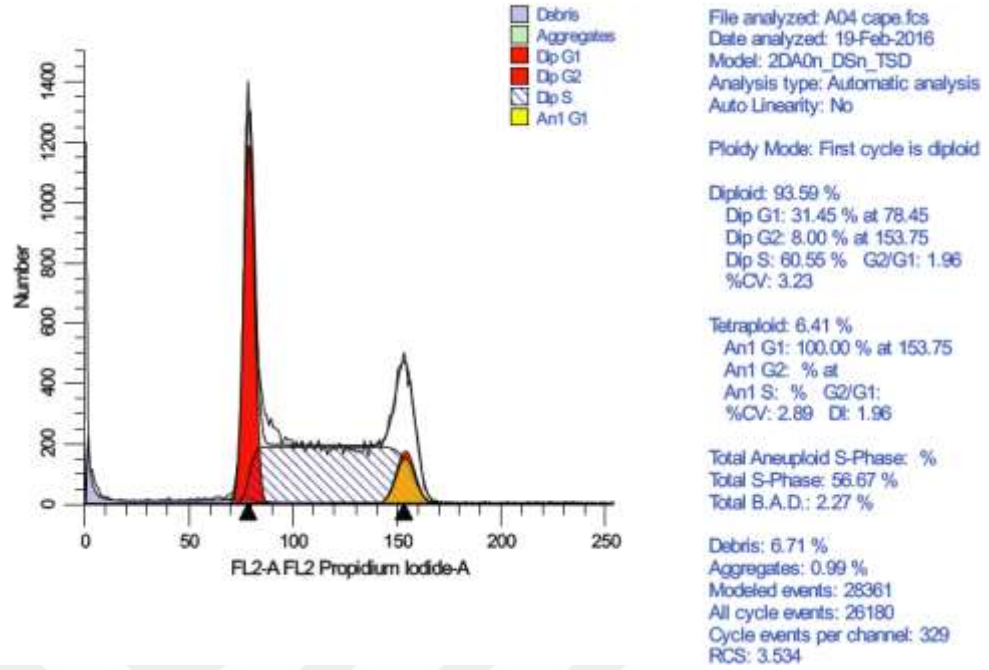
4. BULGULAR

4.1. CAPE'in Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi

Hücre popülasyonlarının ve replikasyon basamaklarının belirlenmesi için kontrol grubu hücreler 3.2.6 da anlatıldığı gibi hazırlandı. İnkübasyon sonrası akım sitometri cihazında 30000 hücre sayıldı ve hücrelerin DNA miktarları Modfit programında değerlendirildi. Kontrol grubunda diploid hücre gruplarında G1 fazındaki hücre oranı %32.6, G2 fazındaki hücre oranı %8, S fazındaki hücre oranı %59.4 olarak bulundu. Tetraploid hücre miktarı %5.61 olup hücrelerin %100'ü G1 fazında idi (Şekil 1). Hücrelerin CAPE ile muamele edilmesinden sonra 3.2.6 da anlatıldığı gibi hazırlanan hücreler inkübe edilerek tekrar akım sitometri cihazında 30000 hücre sayıldı ve hücrelerin DNA miktarları Modfit programında değerlendirildi. CAPE ile muamele edilen hücrelerde %93.5 oranında diploid saptandı, bunlarında %31.4'i G1 fazında, %8'i G2 fazında idi. Geri kalan %60.5 hücre ise S fazında saptandı (Şekil 2). Hücre döngüleri arasında anlamlı fark olmadığı görüldü.

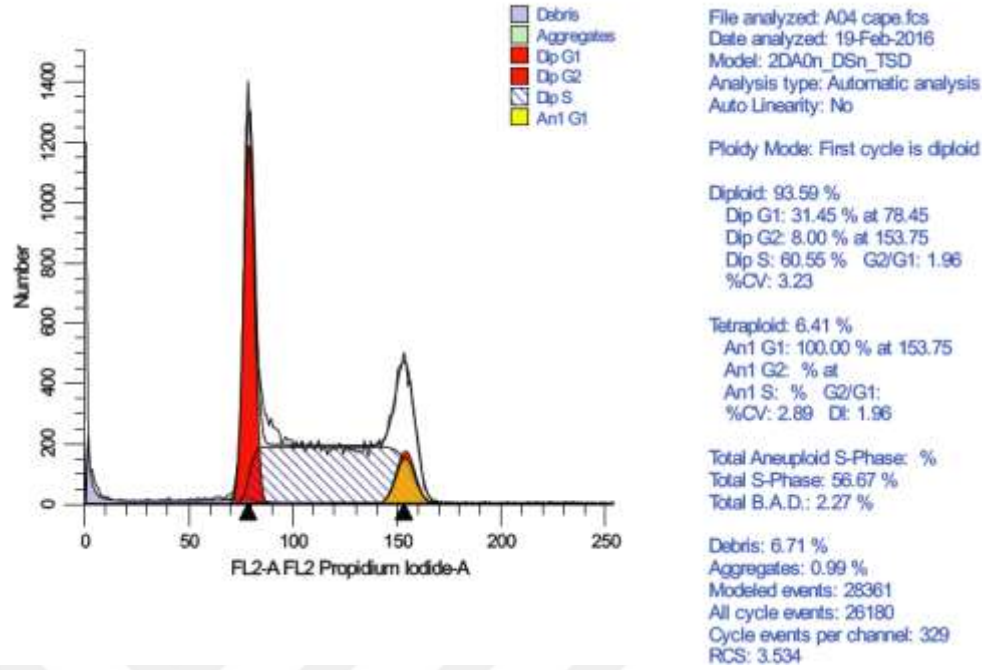


Şekil 1: Kontrol Grubu K562 Hücre Dizilerinde Diploid, Tetraploid ve Anaploid Hücre Guruplarında G1, G2, S Fazındaki Hücre Yüzdeleri

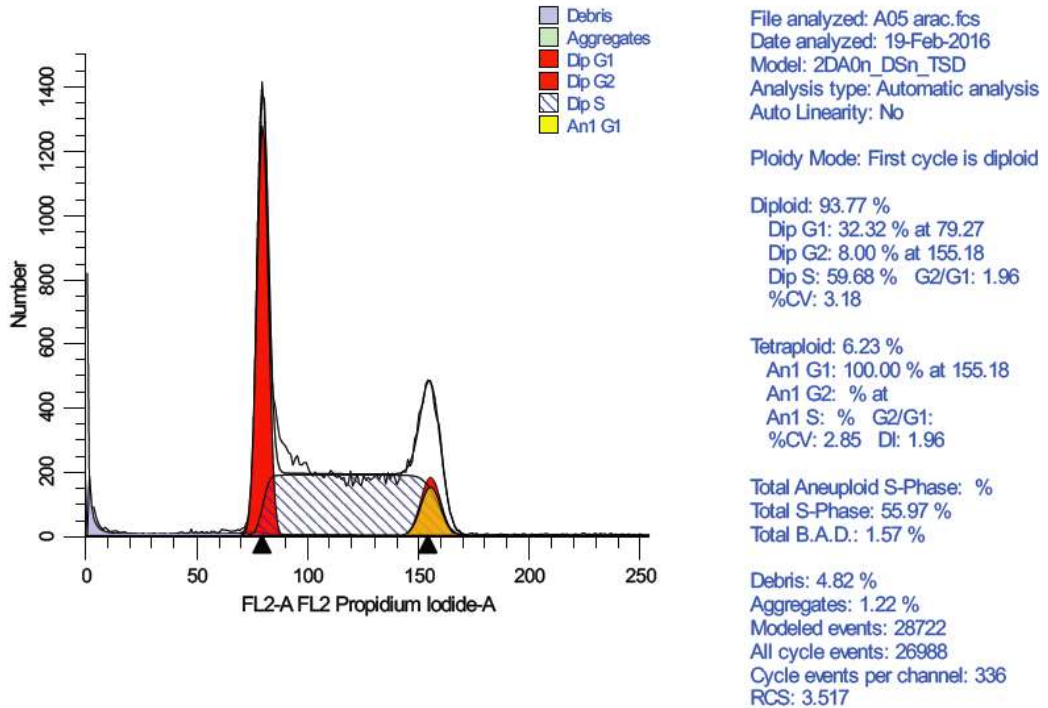


Şekil 2: CAPE ile Muamele Edilen K562 Hücre Dizisinde Diploid, Tetraploid ve Anoploid Hücre Guruplarında G1, G2, S Fazındaki Hücre Yüzdeleri

K562 hücre dizisine 25 nM dozunda ARA-C ilave edilerek 4 gün bekletildi sonrasında 3.2.7 de anlatıldığı gibi hazırlanarak değerlendirildi. Akım sitometrik değerlendirmede diploid hücrelerin oranı %93.5 olup, bunların %31.4'ü G1, %8'i G2 ve %60.5'i S fazında idi. Tetraploid hücre oranı %6.4 ve tümünün G1 fazında olduğu izlendi (Şekil 3). ARA-C eklenen ve bir kısmı ayrılan hücre kültürüne 5 µM dozunda CAPE eklenerek her ikisi ile birlikte 4 gün süre ile muamele edilip CAPE'in hangi mekanizma ile ARA-C'nin ilaç direncini azalttığını gösterebilmek için 3.2.7 de anlatıldığı gibi hücreler hazırlanarak akım sitometride hücre döngüsü için değerlendirildi. Hücrelerin %93.7'sinin diploid olduğu, diploid hücrelerin %32.3'sünün G1 fazında, %8'inin G2 fazında, %59.6'sının S fazında olduğu ve geri kalan tetraploid hücrelerinde %100'ünün G1 fazında olduğu saptandı. Sadece ARA-C ile muamele edilen hücre kültürü kontrol gurubu olarak alındığında anlamlı fark olmadığı görüldü.



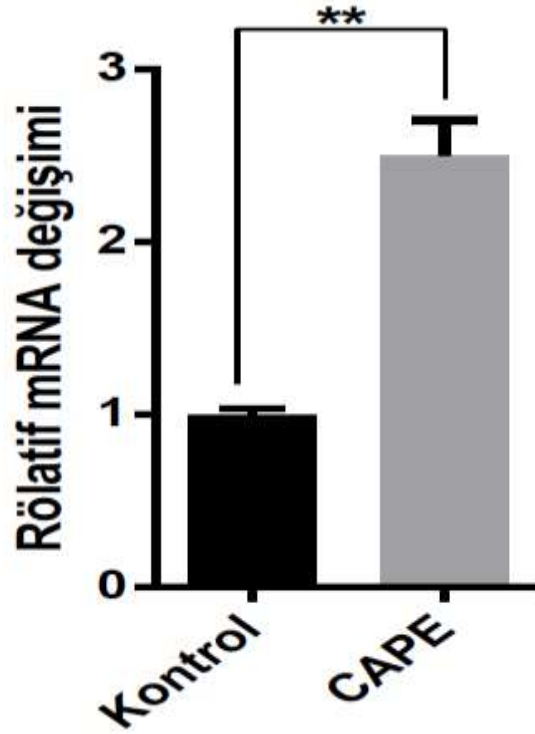
Şekil 3: K562 Hücre Kültüründe ARA- C ile Birlikte Muamele Edilen Hücrelerin Diploid, Tetraploid ve Anaploid Hücre Gruplarında G1, G2, S Fazındaki Hücre Yüzdeleri



Şekil 4: K562 hücre Kültüründe CAPE ve ARA- C ile Birlikte İnkübe Edilen Hücrelerin Diploid, Tetraploid ve Anaploid Hücre Gruplarında G1, G2, S Fazındaki Hücre Yüzdeleri

4.2. CAPE'in TET2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

CAPE'in TET2 gen ekspresyonu üzerine etkisi değerlendirilmesi için 3.2.3. bölümde anlatıldığı şekilde CAPE ile inkübe edilen hücreler ve kontrol gurubu hücrelerden RNA izolasyonu, QIAGEN RNeasy Mini Kit protokolüne göre yapıldı. Hücrelerden izole edilen RNA' dan cDNA sentezi "QuantiTect Reverse Transcription Kit" ile gerçekleştirildi. Real Time PCR, QIAGEN QuantiTect SYBR Green PCR kit protokolü ile TET2 mRNA ekspresyonu delta Ct metoduyla RPLP0 ya karşı normalize edilerek hesaplandı. Sonuç olarak kontrol gurubuna göre CAPE verilen hücre kültürlerinde TET2 gen ekspresyonu 2,5 kat artış tespit edildi ($p<0,001$) (Şekil 5).



Şekil 5: K562 Hücre Dizisinde Kontrol Gurubu ve CAPE Verilen Hücre Kültürünün TET2 Gen Ekspresyonu Düzeylerinin Karşılaştırmalı Grafiği

5. TARTIŞMA

Propolisin bioaktif komponenti olan CAPE kaffeik asidin lipofilik bir derivesi olup, yapısındaki 3,4-dihidroksisinnamik asid'e bağılı olarak kuvvetli fenolik antioksidan özellik taşımaktadır. Aynı zamanda nükleer faktör kappa B (NF-κB)'in p65 subünitinin translokasyonunu engelleyerek, NF-κB'yi inhibe etmekte ve sonuçta DNA sentezinin inhibisyonuna yol açmaktadır. Dolayısıyla anti-kanser özelliğı olan CAPE'in meme, prostat, akciğer, baş boyun, kolon, servisk gibi çeşitli kanser hücre dizilerinde çoğalmayı azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca CAPE normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünü engelleyebilmektedir. Normal hücrelerin CAPE tedavisine kanser hücrelerine göre daha dirençli olması, CAPE ile kanser hücrelerine spesifik bir tedavi olanağı sağlayabilmektedir (124-134).

Yapılan çalışmalarda CAPE tedavisi ile kanser hücrelerinin çoğalması engellenirken aynı zamanda metastaz yapmasında engellendiğı gösterilmiştir (134-136). Ayrıca kanser hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılığını artırmakta ve sonuçta tedaviye direnç gelişmesini engellemektedir (137-147). Birçok hücre serisinde CAPE'in kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediğı ve hücre döngüsünü G1 veya G2/M seviyesinde durdurduğı gösterilmiştir (105, 125, 127, 129, 131, 134, 148, 155). Hücre döngüsü üzerine olan etkileri sadece NF-κB inhibisyonu ile sınırlı olmayıp siklin bağımlı kinazlar, fosfatidilinosid 3-kinaz (PI3-K), mitojen aktive protein kinaz (MAPK) gibi hücre içi sinyal yolları üzerinden gerçekleşmektedir. Farklı hücre dizilerinde CAPE'in etkisinin farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleştiğı yapılan çalışmalarda izlenmiştir.

Servisk kanseri hücre dizisi HeLa ile yapılan çalışmada 50-80 µM CAPE ile NF-κB p65 subunit translokasyonunun engellendiğı sonuçta NF-κB DNA bağlanmasının gerçekleşemediğı ve nükleer transkripsiyonun inhibisyonun bağılı olarak DNA sentezinin engellendiğı gösterilmiştir (156). PC-3 insan prostat kanseri, androjen bağımlı prostat kanseri (LNCaP) ve 104-S hücre dizilerinde 10-20µM CAPE ile c-Myc ve Akt-aracılı hücre içi sinyal iletimini engelleyerek hücre döngüsünün G1 fazında inhibe olduğu izlenmiştir (131,157). LNCaP, 104-R1 tümör hücrelerinin nakledildiğı farelerde yapılan çalışmada CAPE'in hücre döngüsünü durdurduğı fakat apoptozise yol açmadığı, buna karşılık LNCaP hücreleri verilen farelerde Skp2 ve Akt1 protein ekspresyonunun azaldığı saptanmış ve mikro western

dizi çalışmasında, retinoblastoma (Rb), yağ asit sentaz (FAS), c-Myc, Ser807/811, p70S6kinase, Skp2, p90RSK, NF- κ B ve p65 proteinlerinin azaldığı p53, m-TOR, p27Kip1, CK1 siklin A, p21cip1, ser 33, Ser46 proteinlerinin arttığı gösterilmiştir (158). En-Pei IC ve arkadaşları kafeik asit ve türevlerinin (CAPE ve CAPPE) insan kolon kanseri hücre dizilerinde (HCT-116 ve SW-480) G0/G1 fazlarında hücre döngüsünün doz bağımlı olarak durdurduğunu ve bu etkide fosfatidilinositid 3 kinaz (P13-K)/Akt, AMP-aracılı protein kinaz (AMPK) ve m-TOR (Mammalian Target of Rapamycin) sinyal yollarının inhibe olduğunu, sonuç olarak nükleer siklin D1 ve hücre nükleer antijen proteinlerinin azaldığını belirtmişlerdir (159). Ying-Yu Kuo ve arkadaşları ise yanak mukozası kaynaklı primer skuamöz hücreli karsinom hücre dizisi TW2.6 hücrelerinin CAPE ile G1 fazının azaldığını buna karşılık G2/M fazının ve apoptozun arttığını gözlemişlerdir. Hücre döngüsü ve apoptozise olan etkinin retinoblastom protein (Rb), fosfo-Rb Ser807/811, Skp2 ve siklin D1 proteinlerini azaltıp, hücre döngüsünü inhibe eden p27^{Kip} miktarını artışına bağlı olduğunu göstermişlerdir. Rb protein aktivitesinin azalması p53 bağımlı veya bağımsız apoptozisi indüklerken, artan p27^{Kip} düzeyinin hücre çoğalmasını uyararak fosfo-Rb Ser807/811, Skp2, Akt, fosfo-Akt Ser473-308, siklin D1 gibi proteinleri inhibe etmesi hücrelerin G2/M fazında durmasına ve sonuçta hücre çoğalmasının inhibisyonuna yol açmaktadır (159,161,162).

Hematolojik maliniteli hücre serilerinde gözlenen CAPE etkisi solid maliniteli hücre dizilerinden farklılık gösterebilmektedir. Lösemi hücre dizisi HL-60 hücrelerinde—CAPE'in lösemi hücrelerine hızla girdiği, konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak büyümelerini inhibe ettiği gözlenmiş ve hücrelerde BCL-2 azalması, bax ve caspase-3 aktivasyonuna bağlı olarak DNA fragmentasyonla birlikte apoptozisin tipik morfolojik değişikliklerinin geliştiği belirtilmiştir (10). İnsan myeloid lösemi hücre dizisi U937 ve lenfoblastik B hücre dizisi PL104 ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar gözlenirken, CAPE'nin ARH-77 multiple myeloma hücreleri üzerinde doz ve zamana bağlı olarak büyüme, IL-6 sekresyonunu inhibe ettiğini ve apoptozisi indüklediği izlenmiştir (105,109,163,164). Bizim çalışmamızda ise K562 hücre dizilerinde CAPE ile hücre döngüsünün G1, G2, M ve S fazında değişiklik olmadığı gözlemlendi. K562 hücreleri kronik miyeloid lösemisinin blastik kriz evresinden kaynaklanan miyeloid seri hücreleri olduğundan, hücrelerde normal kromozom sayısının yaklaşık 1.5 katı kromozom bulunmaktadır ve hücreler bcr/abl

füzyon geni ekspresyonu nedeni ile apoptozis'e dirençlidirler. Literatüre bakıldığında lösemik hücre dizilerinde CAPE'in hücre döngüsüne etkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Daha önce yaptığımız çalışmamızda K562 hücre dizilerinde izlediğimiz sitozin arabinozid (Ara-C) direncinin CAPE ilavesi ile düzelmesinin mekanizmasına yönelik değerlendirmede, K562 hücrelerinde CAPE ile apoptozis ve hücre döngüsünün etkilenmediğini izledik (165). Bu bulgular bize CAPE'in K562 hücre dizilerinde apoptozis direncini etkileyemediği gösterirken, aynı zamanda hücre döngüsü ve apoptozisten bağımsız farklı bir mekanizmayla etki gösterdiğini telkin etmekteydi.

Hematopoetik öncül hücrelerin malign bir hastalığı olan AML moleküler ve fenotipik olarak heterojen bir hastalıktır. Myeloid öncül hücrelerin gelişim sürecinde hücre döngüsü kontrol basamaklarında, DNA-histon metilasyonu gibi epigenetik olarak çoğalmayı denetleyen mekanizmaların kontrolünün kaybı ve/veya karyotip anomalilerinin eşlik ettiği denovo olarak görülebileceği gibi miyelodisplastik sendrom sonrası sekonder olarakta gelişebilmektedir (166-168). Hastalarda genetik veya epigenetik değişiklikler sıklıkla izlenmekte olup, yapılan çalışmalarda tanı sırasında hastaların yarısında en az bir sitogenetik anomali olduğu tespit edilmiştir (169). AML gelişiminde birden fazla etkenin rol oynaması tedavisinde konvansiyonel tedavilerin kötü prognoza sahip hastalarda yararlarını sınırlandırmaktadır (117). Hasta yaşının artmasıyla beraber prognozun kötüleştiği, komorbid hastalıklar nedeniyle sitotoksik tedavi seçeneklerinin sınırlandırıldığı ve toksisitesi fazla tedavilerin yaşamı tehdit edici yan etkilere sahip olmasından dolayı tedavide normal hücrelere zarar vermeyen, hedefe yönelik ve selektif antitümoral etkili ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (118).

Tet metilsitozin dioksijenaz 2 (TET2) geni 4q24.1 de bulunan epigenetik düzenleyici rolü olan tümör supressör gendir. Hematopoietik kök hücre homeostazında önemli bir düzenleyici olup, TET2 mutasyonu varlığında gerek normal gerekse malign öncül hücrelerin uyarılması artmış myeloproliferasyon ve ekstramedullar hematopoiez'e neden olmaktadır (170). TET2 gen ekspresyonu varlığında 5 metilsitozin 5-hidroksimetilsitozine dönüşmekte, sonuç olarak DNA demetilasyonu ile epigenetik düzenleme ve DNA replikasyonunun kontrolü sağlanmaktadır (171-173). TET2 gen mutasyonları hematolojik malignansilerde sıklıkla izlenmekte olup, kötü prognoz ve hızlı progresyonla ilişkilendirilmişlerdir.

AML'de %11-24, MDS'de %11-26 ve MDS/MPH'de %37-44 oranında görülmektedir. Ayrıca mutasyon varlığında MDS ve KMML'li hastalarda AML'ye dönüşüm sıklıkla izlenmektedir (109, 171-175). Yapılan çalışmalarda MDS'li hastalarda TET2 mutasyon varlığının bağımsız prognostik öneme sahip olduğu tanımlanmış ve aynı zamanda kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Bir başka metaanalizde ise TET2 mutasyonunun MDS'li hastalarda sağ kalımla anlamlı ilişkisinin bulunmadığı bildirilmiştir. Ayrıca TET2 gen ekspresyonunun artırılması ile AML hastalarında klonal kök hücrelerin differansiyasyonunun sağlanabileceği belirtilmektedir (177, 178).

Çalışmamızda K562 hücre dizilerinde 5µM CAPE ile TET2 gen ekspresyonunda 2,5 kat artış izlendi. Hücre döngüsü ve apoptosisten bağımsız olarak izlenen bu artış bize bcr/abl füzyon geni ekspresyonu nedeni ile apoptosise dirençli ve yüksek proliferasyon hızına sahip hücreler artan tümör supresyon geni ekspresyonu sonucu DNA metilasyonunun azalabileceğini ve dolayısıyla hücre çoğalmasının engellenip farklılaşmasının sağlanabileceğini göstermekteydi. CAPE'in normal hücreleri etkilemediği hatta kemoterapi ve radyoterapinin yan etkilerinden koruduğu dikkate alındığında, lösemi veya MDS tedavilerine CAPE ilavesinin TET2 gen ekspresyonu artırıcı etkisiyle katkı sağlayabileceğini düşündürmekle birlikte, bu sonuçların ileri çalışmalarda desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇLAR

Propolisin etken maddesi olan Kafeik Asit Fenetil Ester'in (CAPE) K562 hücre serilerinde hücre döngüsüne ve TET2 gen ekspresyonuna bakılan bu çalışmada;

- CAPE'in hücre döngüsüne etisi kontrol gurubu ve CAPE ile inkübe edilen hücre serilerinin hücre döngüsündeki faz basamakları karşılaştırılarak değerlendirildi. Kontrol grubunda diploid hücre gruplarında G1 fazındaki hücre oranı %32.6, G2 fazındaki hücre oranı %8, S fazındaki hücre oranı %59.4, olarak bulundu. Tetraploid hücre miktarı %5.61 olup hücrelerin %100'ü G1 fazında idi. CAPE ile muamele edilen hücrelerde %93.5 oranında diploidi saptandı, bunlarında %31.4'i G1 fazında, %8'i G2 fazında idi. Geri kalan %60.5 hücre ise S fazında saptandı. Her iki seride Hücre döngüleri arasında anlamlı fark olmadığı görüldü.
- CAPE'in hangi mekanizma ile ARA-C'nin ilaç direncini azalttığını gösterebilmek için ARA-C ilave edilen grup akım sitometri ile değerlendirildi. Diploid hücrelerin oranı %93.5 olup, bunların %31.4'ü G1, %8'i G2 ve %60.5'i S fazında idi. Tetraploid hücre oranı %6.4 ve tümünün G1 fazında olduğu izlendi. ARA-C eklenen ve bir kısmı ayrılan hücre kültürüne 5 µM dozunda CAPE eklenip hücre serisi değerlendirildi. Hücrelerin %93.7'sinin diploid olduğu, diploid hücrelerin %32.3'sünün G1 fazında, %8'inin G2 fazında, %59.6'sının S fazında olduğu ve geri kalan tetraploid hücrelerinde %100'ünün G1 fazında olduğu saptandı. Sadece ARA-C ile muamele edilen hücre kültürü kontrol gurubu olarak alındığında anlamlı fark olmadığı görüldü.
- CAPE'in TET2 gen ekspresyonu üzerine etkisi değerlendirilmesi için CAPE ile inkübe edilen hücreler ve kontrol gurubu hücrelerden RNA izolasyonu sağlandı. Hücrelerden izole edilen RNA' dan Green PCR kit protokolü ile TET2 mRNA ekspresyonu delta Ct metoduyla RPL0 ya karşı normalize edilerek hesaplandı. Sonuç olarak kontrol gurubuna göre CAPE verilen hücre kültürlerinde TET2 gen ekspresyonu 2,5 kat artış tespit edildi ($p<0,001$).

7. KAYNAKLAR

1. Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia. *Experimental Hematology*. 2009; 37 (6): 649-658.
2. Vignetti M, Orsini E, Petti MC, Moleti ML, Andrizzi C, et al. Probability of long-term disease-free survival for acute myeloid leukemia patients after first relapse: a single-centre experience. *Annals of oncology*, 1996; 7(9): 933-938.
3. Abdel Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013; 121(18):3563-3572
4. Ono R, Taki T, Taketani T, Taniwaki M, Kobayashi H, et al. LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acutemyeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11) (q22;q23). *Cancer Res* 2002; 62(14): 4075–4080.
5. Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure- activity relationship. *J. Agric. Food Chem*. 2002; 50(3): 468-472.
6. Borelli F, Izzo AA, Carlo GD, Maffia P, Russo A, et al. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia*. 2002; 73(1):38-43.
7. Wood P, Burgess R, MacGregor A, Yin JA. P-glycoprotein expression on acute myeloid leukemia blast cells at diagnosis predicts response to chemotherapy and survival. *Br J Haematol* 1994;87(3):509-514.
8. Bhimani RS, Troll W, Grunberger D, Frenkel K. Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Res*. 1993; 53(19): 4528-4533.
9. Lee SK, Song L, Mata-Greenwood E, Kelloff GJ, Steele VE, et al. Modulation of in vitro biomarkers of the carcinogenic process by chemopreventive agents. *Anticancer Res*. 1999; 19(1): 35-44.
10. Chen YJ, Shiao MS, Hsu ML, Tsai TH, Wang YS. Induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester through activation of caspase-3, downregulation of bcl-2 and upregulation of Bax in human leukemic HL-60 cells. *J. Agri. Food Chem*. 2001; 49(11): 5615-5619.
11. Chen YJ, Shiao MS, Wang SY. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL60 cells. *Anti-cancer Drug*. 2001; 12(2): 143-149.
12. Yamamoto JF, Goodman MT. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics. *Cancer Causes Control*. 2007; 19 (4): 379-390.

13. Aquino VM. Acute myelogenous leukemia. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*. 2002; 32 (2):50–58.
14. Forman D, Stockton D, Moller H, Babb P, De Angelis R, et al. Cancer prevalence in the UK: results from the EUROPREVAL study. *Ann Oncol* 2003; 14(4): 648–654.
15. Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 2006; 107(9): 2099–2107.
16. LAG EM, Kosary CL, Hankey BF editors. National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review 1975-2000 [İnternet].2003 [son güncelleme Nisan 2005; 28 Aralık 2018 tarihinde erişildi]. Erişim adresi: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2000/
17. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER): Myeloid leukemia: 5-Year relative and period survival by race, sex, diagnosis year and age, 1975-2011 NIH2011 [İnternet].2018[son güncelleme eylül 2018; 3 ocak 2019 tarihinde erişildi]. Erişim Adresi: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>
18. Taylor GM, Birch, JM. The Hereditary Basis Of Human Leukemia. In: Henderson, ES, Lister TA, Greaves MF, ed. *Leukemia*. 1st ed Philadelphia: WB Saunders, 1996; p. 210–245.
19. Fong CT, Brodeur GM. Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 28(1):55–76.
20. Sandler, DP, Ross JA. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin Oncol* 1997; 24(1): 3–16.
21. Linet MS, Devesa SS. Epidemiology Of Leukemia Overview And Patterns Of Occurrence. In: Henderson, ES, Lister TA, Greaves MF, ed. *Leukemia*. Philadelphia: WB Saunders, 2002: p. 131–151.
22. Estey E, Thall P, Beran M, Kantarjian H, Pierce S, et al. Effect of diagnosis (refractory anemia with excess blasts, refractory anemia with excess blasts in transformation, or acute myeloid leukemia [AML]) on outcome of AML-type chemotherapy. *Blood* 1997; 90(8): 2969–2977.
23. Mufti GJ, Flandrin G, Schaefer HE, Sendberg AA, Kanfer EJ. An atlas of malignant haematology, cytology, histology and cytogenetics. Dunitz M, ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996; p. 78.
24. Argyle JC, Benjamin DR, Lampkin B, Hammond D. Acute nonlymphocytic leukemias of childhood: Inter-observer variability and problems in the use of the FAB classification. *Cancer* 1989; 63(2): 295–301.

25. Brunning RD, Vardiman J, Matutes E. Acute myeloid leukemia. In: Jaffe, E, Haris N, Stein H, Vardiman J, ed. World Health Organization classification of tumours pathology and genetics tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Pres. 2001: p. 75–107.
26. Vardiman JW, Haris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100(7): 2292–2302.
27. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning DG, Borowitz MJ, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114(5): 937-951.
28. Meyers CA, Albitar M, Estey E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2005; 104(4): 788-793.
29. Baer MR, Barcos M, Farrell H. Acute myelogenous leukemia with leukemia cutis: Eighteen cases seen between 1969 and 1986. *Cancer* 1989; 63(11): 2192–2200.
30. Castagnola C, Nozza A, Corso A, Bernasconi C. The value of combination therapy in adult acute myeloid leukemia with central nervous system involvement. *Haematologica* 1997; 82(5): 577-580.
31. Cassileth PA, Sylvester LS, Bennett JM, begg JB. High peripheral blast count in adult acute myelogenous leukemia is a primary risk factor for CNS leukemia. *J Clin Oncol* 1988; 6(3): 495–498.
32. Peterson BA, Brunning RD, Bloomfield CD, Hurd DD, et al. Central nervous system involvement in acute nonlymphocytic leukemia: A prospective study of adults in remission. *Am J Med* 1987; 83(3): 464–470.
33. Cohen PR, Talpaz M, Kurzrock R. Malignancy-associated Sweet's syndrome: review of the world literature. *J Clin Oncol* 1988; 6(12): 1887–1897.
34. Wiernik PH. Extramedullary manifestations of adult leukemia. American Cancer Society atlas of clinical oncology adult leukemias. London: PMPH. 2001: p.275–305.
35. Yanada M, Matsushita T, Suzuki M, Kiyoi H, Yamamoto K, et al. Disseminated intravascular coagulation in acute leukemia: clinical and laboratory features at presentation. *Eur J Haematol.* 2006; 77(4): 282-287.
36. Nagendra S, Meyerson H, Skallerud G, Rosenthal N. Leukemias resembling acute promyelocytic leukemia, microgranular variant. *Am J Clin Pathol.* 2002; 117(4):651-657.
37. Lichtman MA, Rowe JM. Hyperleukocytic leukemias: rheological, clinical, and therapeutic considerations. *Blood* 1982; 60(2): 279–283.

38. Baer MR. Management of unusual presentations of acute leukemia. *Hematol/OncolClin North Am* 1993; 7(1): 275–292.
39. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010; 115(3): 453-474.
40. Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001; 14(3): 497-529.
41. Mro'zek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004; 18(2): 115-136.
42. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010; 116(3): 354-365.
43. Nucifora G, Rowley JD. AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995; 86: 1-14.
44. Nucifora G, Birn DJ, Erickson P, Gao J, LeBeau MM, et al. Detection of DNA rearrangements in the AML1 and ETO loci and of an AML1/ETO fusion mRNA in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia. *Blood* 1993; 81(4): 883-888.
45. Chang VT, Aviv H, Howard LM, Padberg F. Acute myelogenous leukemia associated with extreme symptomatic thrombocytosis and chromosome 3q translocation: case report and review of literature. *Am J Hematol*. 2003; 72(1): 20-26.
46. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA et al. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues in: Bosman FT, Campo E Editor. Genetic abnormalities and oncogenes 4th ed. Lyon IARC Press; 2008; p.205.
47. Berger R, Bernheim A, Sigaux F, Daniel MT, Valensi F, et al. Acute monocytic leukemia chromosome studies. *Leuk Res* 1982; 6:17-21, 23-26.
48. The Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia: A prospective study of acute nonlymphocytic leukemia. Chicago, Illinois, USA, September 2-7, 1982. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 11(3): 249-360.
49. Godley LA, LeBeau MM. Cytogenetics and molecular abnormalities. In: Williams Hematology, 8th ed. Kaushansky, K, Lichtman, MA, Beutler, E, et al. Editor. McGraw-Hill, Burr Ridge, IL 2010.

50. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelder-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol* 2008; 26(29): 4791-4797.
51. Soenen V, Preudhomme C, Roumier C, Daudignon A, Lai JL, et al. 17p Deletion in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ. *Blood* 1998; 91(3): 1008-1015.
52. Olopade OI, Thangavelu M, Larson RA, Mick R, Kowal-Vern A, et al. Clinical, morphologic, and cytogenetic characteristics of 26 patients with acute erythroblastic leukemia. *Blood* 1992; 80(11): 2873-2882.
53. O'Regan S, Carso S, Chesney RW, Drummond KN. Electrolyte and acid-base disturbances in the management of leukemia. *Blood* 1977; 49(3): 345-353.
54. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9(10): 1783-1786.
55. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997; 90: 2863-2892.
56. Robertson, MJ., Ritz, J. Prognostic significance of the surface antigens expressed by leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 1994; 13(1): 15-22.
57. Paietta E, Andersen J, Gallagher R, Rowe J, Wiernik PH, et al. The immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL): an ECOG study. *Leukemia* 1994; 8: 1108-1112.
58. Sekeres MA, Peterson B, Dodge RK, Mayer RJ, Moore JO, et al. Differences in prognostic factors and outcomes in African Americans and whites with acute myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103:4036.
59. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2009; 361: 1249.
60. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006; 368(9550): 1894-1907.
61. RO Dillman, RB Davis, MR Green, RB Weiss, AJ Gottlieb, et al. A comparative study of two different doses of cytarabine for acute myeloid leukemia: a phase III trial of Cancer and Leukemia Group B. *Blood*. 1991; 78:2520-2526.

62. Rowe JM, Kim HT, Cassileth PA, Lazarus HM, Litzow MR, et al. Adult patients with acute myeloid leukemia who achieve complete remission after 1 or 2 cycles of induction have a similar prognosis: a report on 1980 patients registered to 6 studies conducted by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer* 2010; 116(21): 5012-5021.
63. Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, Lazarus HM, Rowe JM, et al. Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med.* 1998;339(23):1649-1656.
64. Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, de Witte T, Labar B, et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 1995; 332(4):217-223.
65. Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RM, Hann IM, Rees JK, et al. Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. *Lancet.* 1998;351(9104):700-708.
66. Nathan PC, Sung L, Crump M, Beyene J. Consolidation therapy with autologous bone marrow transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(1):38-45.
67. Löwenberg B, Zittoun R, Kerkhofs H, Jehn U, Abels J, et al. On the value of intensive remission-induction chemotherapy in elderly patients of 65+ years with acute myeloid leukemia: a randomized phase III study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group. *J Clin Oncol* 1989(9); 7:1268-1274.
68. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2009; 113(9):1875-1891.
69. Stevens RF, Hann IM, Wheatley K, Stevens RF. Marked improvement in outcome with chemotherapy alone in pediatric acute myeloid leukemia: results of MRC AML10 trial. *B J Haematology* 1998; 101(1): 130-140.
70. Stanisic S, Kalaycio M. Treatment of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2002; 2: 287-295.
71. Estey E. A stratification system for evaluating and selecting therapies in patients with relapsed or primary refractory acute myelogenous leukemia. *Blood.* 1996; 88: 756-760.
72. Herzig RH, Lazarus HM, Wolff SN, Phillips GL, Herzig GP. High dose cytosine arabinoside therapy with and without anthracycline antibiotics for remission reinduction of acute nonlymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 1985; 3(7): 992-998.

73. Carella AM, Cascavilla N, Greco MM, Melillo L, Sajeve MR, et al. Treatment of poor risk acute myeloid leukemia with fludarabine, cytarabine and GCSF (flag regimen): a single study. *Leuk Lymphoma* 2001; 40(3-4):295-303.
74. Jackson G, Taylor P, Smith GM, Marcus R, Smith A, et al. A multicentre, open non-comparative phase II study of a combination of fludarabine phosphate, cytarabine and granulocyte colony-stimulating factor in relapsed and refractory acute myeloid leukemia and de novo refractory anemia with excess of blast in transformation. *B J Haematol.* 2001; 112(1):127-137.
75. Ratip S. Effectiveness of FLAG chemotherapy in refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Turk. J. Haematol.* 2001; 18:53-58.
76. Webb HK. Treatment of relapsed AML in children. *B J Haematol.* 1999; 104:420-426.
77. De la Rubia J, Regadera A, Martin G, et al. FLAG-IDA regimen (fludarabine, cytarabine, idarubicin and G-CSF) in the treatment of patients with high-risk myeloid malignancies. *Leuk Res* 2002 26(8):725-730.
78. Fleishhack G, Hasan C, Graf N. IDA-FLAG, an effective remission induction therapy for poor prognosis AML of childhood prior to allogeneic or autologous bone-marrow transplantation: experience of phase II trial. *Br J Haematol.* 1998; 102:647-655.
79. Hänel M, Friedrichsen K, Hänel A, Herbst R, Morgner A, et al. MITO-FLAG as salvage therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Onkologie.* 2001; 24(4):356-360.
80. Thomas X, Cambier N, Taksin AL, Reman O, Vekhoff A, et al. Dose-escalation study of single dose mitoxantrone in combination with timed sequential chemotherapy in patients with refractory or relapsing acute myelogenous leukemia. *Leukemia Research* 2000; 24(11):957-963.
81. Liu Yin JA, Wheatley K, Rees JK, Burnett AK. Comparison of sequential versus standard chemotherapy as reinduction treatment with or without cyclosporine, in refractory/relapsed acute myeloid leukemia: results of the UK MRC AML-R trial. *B J Haematol.* 2001; 113:713-726.
82. Karanes C, Kopecky KJ, Head DR, Grever MR, Hynes HE, et al. A phase III comparison High dose Ara-C(HDAC) versus HDAC plus mitoxantrone in the treatment of first relapsed or refractory acute myeloid leukemia Southwest Oncology Group study. *Leukemia Research.* 1999; 23(9):784-794.
83. Webb KH. Management of relapsed acute myeloid leukemia. *B J Haem.* 1999; 106:851-859.
84. Gorin NC, Estey E, Jones RJ, Levitsky HI, Borrello I, et al. New developments in the therapy of acute myelocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program-Review).* 2000; 1: 69-89.

85. Estey EH. New drugs for therapy of AML. *Leukemia* 2002; 16:306-309.
86. Baer MR, George SL, Dodge RK, Cooke K, Caligiuri AM, Powell BL, et al. Phase III study of PSC-833 modulation of multidrug resistance (MDR) in previously untreated acute myeloid leukemia (AML) patients (PTS) >60 years (CALGB 9720) [Abstract]. *Blood* 1999;94 (1):383.
87. Visani G, Milligan D, Leoni F, Chang J, Kelsey S, et al. Combined action of Valdospar, a novel MDR reversing agent, with mitoxantrone, etoposide and cytarabine in poor prognosis acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2001; 15:764-771.
88. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor risk acute myeloid leukemia: a SWOG study. *Blood*. 2000; 98:3212-3220.
89. Bassan R, Lerede T, Borleri G, Chiodini B, Rossi A Et al. Phase I trial with escalating doses of idarubicin and multidrug resistance reversal by short course CsA, sequential acute leukemia. *Haematologica*. 2002; 87:257-263.
90. Paulino N, Teixeira C, Martins R, Scremin A, Dirsch VM, et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. *Planta Med* 2006; 72(10): 899-906.
91. Tekeli A. Etlik civciv rasyonların da doğal büyüme uyarıcı olarak bitkisel ekstraktların ve propolisin kullanım olanakları, Doktora Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2007.
92. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electronmicroscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med* 1994; 60(3): 222-227.
93. Dota KF, Consolaro ME, Svidzinski TI, Bruschi ML. Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 20(1): 953.
94. Nolkemper S, Reichling J, Sensch KH, Schnitzler P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine* 2010; 17(2):132-138.
95. Watanabe MA, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol* 2011; 63(11):1378-1386.
96. Çam H. Sıçanlarda aspirin ile uyarılan gastritin önlenmesinde kafeik asit fenetilester'in etkinliğinin araştırılması, Uzmanlık Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2007.
97. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 1988; 44: 230-232.

98. Sawicka D, Car H, Borawska MH, Nikliński J. The anti cancer activity of propolis. *Folia Histo chem Cytobiol* 2012; 50(1):25-37.
99. Sulaiman GM, Ad'hiah AH, Al-Sammarrae KW, Bagnati R, Frapolli R, et al. Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(5):1632-1641.
100. Hehlgans S, Lange I, Eke I, Kammerer B, Cordes N. Human head and neck squamous cell carcinoma cell lines are differentially radiosensitised by the honeybee product Propolis. *Int J Radiat Biol* 2011; 87(3):243-253.
101. Kamiya T, Nishihara H, Hara H, Adachi T. Ethanol Extract of Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells through Endoplasmic Reticulum Stress. *J Agric Food Chem* 2012; 60(44):11065-11070.
102. Vatansever HS, Sorkun K, Deliloğlu İ, Gurhan S, Ozdal-Kurt F, et al. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem* 2010 112(6), 546-556.
103. Avci CB, Gündüz C, Baran Y, Sahin F, Yılmaz S, et al. Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137(1): 41-47.
104. Chen MJ, Chang WH, Lin CC, Liu CY, Wang TE, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatology* 2008; 8(6):566-576.
105. JiN UH, Song KH, Motomura M, Suzuki I, Gu YH, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Mol Cell Biochem* 2008; 310(1-2):43-48.
106. Xiang D, Wang D, He Y, Xie J, Zhong Z, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs* 2006; 17(7):753-762.
107. Su ZZ, Lin J, Prewett M, Goldstein NI, Fisher PB . Apoptosis mediates the selective toxicity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) toward oncogene-transformed rat embryo fibroblast cells. *Anticancer Res* 1995; 15(5):1841-188.
108. Lee YY, Kao CL, Tsai PH, Tsai TH, Chiou SH, et al. Caffeic acid phenethyl ester preferentially enhanced radiosensitizing and increased oxidative stress in medulloblastoma cell line. *Childs Nerv Syst* 2008; 24(9):987-994.
109. Cavaliere V, Papademetrio DL, Lorenzetti M, Valva P, Preciado MV, et al. Caffeic Acid Phenylethyl Ester and MG-132 Have Apoptotic and Antiproliferative Effects on Leukemic Cells But Not on Normal Mononuclear Cells. *Transl Oncol* 2009; 2(1):46-58.
110. Omene CO, Wu J, Frenkel K. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells. *Invest New Drugs* 2012; 30(4):1279-1288.

111. Dunn SE, Hardman RA, Kari FW, Barret JC. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) alters drug sensitivity of HBL100 human breast cancer cells by inhibition of apoptosis induced by diverse anticancer drugs. *Cancer Res* 1997; 57:2687-2693.
112. Ferreira CG, Span SW, Peters GJ, Kruyt FAE, Giaccone G. Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Anticancer Res* 2000; 60:7133-7141.
113. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 26:239-257.
114. Kerr JF, Winterford CM. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73:2013-2026.
115. Martin C, Zhang Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19(3):266-272
116. Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 2006; 1(2):76-80.
117. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 2008;454(7205):766-770.
118. Ding Y, Harada Y, Imagawa J, Kimura A, Harada H. AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;114(25):5201-5205.
119. Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 2007; 67:946-950.
120. Altucci L, Clarke N, Nebbioso A, Scognamiglio A, Gronemeyer H. Acute myeloid leukemia: Therapeutic Impact OfEpigenetic Drugs. *European Journal of Cancer*. 2005; 37: 1752–1762.
121. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myolegenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 1975; 45(3): 321-333
122. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, et al. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 1976; 18(4):421-431
123. Anderson LC, Jokinen M, Gahmberg CG. Induction of erythroid differentiation in the human leukemia cell line K562. *Naature*, 1979; 278:364-365
124. Lin HP, Lin CY, Liu CC, Su L., Huo C, et al. Caffeic Acid phenethyl ester as a potential treatment for advanced prostate cancer targeting Akt signaling. *Int. J. Mol. Sci*. 2013; 14:5264–5283.

125. Nomura M, Kaji A, Ma W, Miyamoto K, Dong Z. Suppression of cell transformation and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester. *Mol. Carcinog.* 2001; 31:83–89.
126. Wu J, Omene C, Karkoszka J, Bosland M, Eckard J, et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Lett.* 2011; 308:43–53.
127. Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N, Nakaki T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NF κ B and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:6017–6026.
128. McEleny K, Coffey R, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RW. Caffeic acid phenethyl ester-induced PC-3 cell apoptosis is caspase-dependent and mediated through the loss of inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int.* 2004; 94:402–406.
129. Chen MF, Wu CT, Chen YJ, Keng PC, Chen WC. Cell killing and radiosensitization by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in lung cancer cells. *J. Radiat. Res.* 2004; 45:253–260.
130. Lin HP, Kuo LK, Chuu CP. Combined treatment of curcumin and small molecule inhibitors suppresses proliferation of A549 and H1299 human non-small-cell lung cancer cells. *Phytother. Res.* 2011; 26:122–126.
131. Chuu CP, Lin HP, Ciaccio MF, Kokontis JM, Hause RJ, et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. *Cancer Prev. Res. (Phila)* 2012; 5:788–797.
132. Lee YT, Don MJ, Hung PS, Shen YC, Lo YS, et al. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer Lett.* 2005; 223:19–25
133. Onori P, DeMorrow S, Gaudio E, Franchitto A, Mancinelli R, et al. Caffeic acid phenethyl ester decreases cholangiocarcinoma growth by inhibition of NF- κ B and induction of apoptosis. *Int. J. Cancer.* 2009; 125:565–576.
134. Hung MW, Shiao MS, Tsai LC, Chang GG, Chang TC. Apoptotic effect of caffeic acid phenethyl ester and its ester and amide analogues in human cervical cancer ME180 cells. *Anticancer Res.* 2003; 23:4773–4780.
135. Shigeoka Y, Igishi T, Matsumoto S, Nakanishi H, Kodani M, et al. Sulindac sulfide and caffeic acid phenethyl ester suppress the motility of lung adenocarcinoma cells promoted by transforming growth factor- β through Akt inhibition. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2004; 130:146–152.
136. Weyant MJ, Carothers AM, Bertagnolli ME, Bertagnolli MM. Colon cancer chemopreventive drugs modulate integrin-mediated signaling pathways. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6:949–956.

137. Akyol S, Ginis Z, Armutcu F, Ozturk G, Yigitoglu M. *Ret al.* The potential usage of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against chemotherapy-induced and radiotherapy-induced toxicity. *Cell Biochem. Funct.* 2012; 30:438–443.
138. Yagmurca M, Erdogan H, Iraz M, Songur A, Ucar M, et al. Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clin. Chim. Acta.* 2004; 348:27–34.
139. Fadillioglu E, Oztas E, Erdogan H, Yagmurca M, Sogut S, et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *J. Appl. Toxicol.* 2004; 24:47–52.
140. Irmak MK, Fadillioglu E, Sogut S, Erdogan H, Gulec M, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester and α -tocopherol on reperfusion injury in rat brain. *Cell Biochem. Funct.* 2003; 21:283–289.
141. Iraz M, Ozerol E, Gulec M, Tasdemir S, Idiz N, et al. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. *Cell Biochem. Funct.* 2006; 24:357–361.
142. Yilmaz HR, Sogut S, Ozyurt B, Ozugurlu F, Sahin S, et al. The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: Protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol. Ind. Health.* 2005; 21:67–73.
143. Oktem F, Yilmaz HR, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, et al. Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: The role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol. Ind. Health.* 2006; 22:241–247.
144. Ozyurt H, Sogut S, Yildirim Z, Kart L, Iraz M, et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on bleomycine-induced lung fibrosis in rats. *Clin. Chim. Acta.* 2004; 339:65–75.
145. Albukhari AA, Gashlan HM, El-Beshbishy HA, Nagy AA, Abdel-Naim AB. Caffeic acid phenethyl ester protects against tamoxifen-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2009; 47:1689–1695.
146. Yildiz OG, Soyuer S, Saraymen R, Eroglu C. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on radiation induced lung injury in rats. *Clin. Investig. Med.* 2008; 31:242–247.
147. Chen YJ, Liao HF, Tsai TH, Wang SY, Shiao MS. Caffeic acid phenethyl ester preferentially sensitizes CT26 colorectal adenocarcinoma to ionizing radiation without affecting bone marrow radioresponse. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2005; 63:1252–1261.
148. Chen YJ, Shiao MS, Hsu ML, Tsai TH, Wang SY. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49:5615–5619.

149. Lee YJ, Kuo HC, Chu CY, Wang CJ, Lin WC, et al. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66:2281–2289.
150. Su ZZ, Lin J, Grunberger D, Fisher PB. Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. *Cancer Res.* 1994; 54:1865–1870.
151. Lin YH, Chiu JH, Tseng WS, Wong TT, Chiou SH, et al. Antiproliferation and radiosensitization of caffeic acid phenethyl ester on human medulloblastoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006; 57:525–532.
152. He YJ, Liu BH, Xiang DB, Qiao ZY, Fu T, et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of SW480 colorectal tumor cells involves β -catenin associated signaling pathway down-regulation. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12:4981–4985
153. Kuo HC, Kuo WH, Lee YJ, Lin WL, Chou FP, et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett.* 2006; 234:199–208.
154. Wang D, Xiang DB, He YJ, Li ZP, Wu XH, et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells *in vitro*. *World J. Gastroenterol.* 2005;11: 4008–4012.
155. Xiang D, Wang D, He Y, Xie J, Zhong Z, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the β -catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs.* 2006; 17:753–762
156. Natarajan K, Singh S, Burke TR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93:9090–9095.
157. Lin HP, Jiang SS, Chuu CP. Caffeic acid phenethyl ester causes p21 induction, Akt signaling reduction, and growth inhibition in PC-3 human prostate cancer cells. *PLoS ONE.* 2012; 7:31286.
158. Lin H-Y, Lin CY, Huo C, Hsiao PS, Su LS, et al. Caffeic acid phenethyl ester induced cell cycle arrest and growth inhibition in androgen-independent prostate cancer cells via regulation of Skp2, p53, p21^{Cip1} and p27^{Kip1}. *Ontarget,* 2015; 6(9): 6684-6707.
159. En-Pei Isabel Chiang, Shu-Yao Tsai, Yueh-Hsiung Kuo, Man-Hui Pai, Hsi-Lin Chiu, et al. Caffeic Acid Derivatives Inhibit the Growth of Colon Cancer: Involvement of the PI3-K/Akt and AMPK Signaling Pathways. *PLoS One.* 2014; 9(6): 99631.

160. Kuo YY, Tim WT, Su LC, Chung CJ, Lin CY, et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Is a Potential Therapeutic Agent for Oral Cancer. *J. Mol. Sci.* 2015; 16(5), 10748-10766.
161. Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol.* 1999;1(4):193-199.
162. Tsvetkov LM, Yeh, KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H. p27Kip1 ubiquitination and degradation is regulated by the SCFSkp2 complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr. Biol.* 1999; 9:661–664.
163. Koru Ö, Avcu F, Tanyüksel M, Ural AU, Araz RE, et al. Cytotoxic effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the human multiple myeloma cell line. *Turk J Med Sci* 2009; 39 (6): 863-870.
164. Guo Z, Zhang SK, Zou Z, Fan RH, Lyu XD. Prognostic significance of TET2 mutations in myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. *Leuk Res.* 2017; 58:102-107.
165. İnce SM. CAPE'in (Kafeik AsitFenetil Ester) lösemi hücre serilerindeki ilaç direncine etkisi. [Tez]. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2016.
166. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2009; 361:1872-1885.
167. Nolte F, Hofmann WK. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Ann Hematol.* 2008; 87:777-795.
168. Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, Bloomfield CD, De Castro CM, et al. Myelodysplastic syndromes: clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2013; 11:838-874.
169. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 2001; 98: 1312-1320.
170. Nakajima H, Kunimoto H. TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci.* 2014; 105:1093–1099.
171. Zhang L, Padron E, Lancet J. The molecular basis and clinical significance of genetic mutations identified in myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 2015; 39:6–17.
172. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics.* 2009; 41:838-842.

173. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England journal of medicine*. 2009; 360:2289-2301.
174. Nibourel O, Kosmider O, Cheok M, Boissel N, Renneville A, et al. Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. *Blood*. 2010; 116:1132-1135.
175. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. TET2 mutations improve the ew European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of clinical oncology*. 2011; 29:1373-1381.
176. Kim M, Yahng SA, Kwon A, Park J, Jeon YW, et al. Mutation in TET2 or TP53 predicts poor survival in patients with myelodysplastic syndrome receiving hypomethylating treatment or stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2015; 50:1132-1134.
177. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, Racœur C, Jooste V, et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2009; 94: 1676-1681.
178. Yun Lin, Zhijuan Lin, Kun Cheng, Zhihong Fang, Zhifeng Li, et al. Prognostic role of *TET2* deficiency in myelodysplastic syndromes: A meta-analysis *Oncotarget*, 2017; 8 (26): 43295-43305.