

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

CAPE'İN (KAFFEİK ASİT FENETİL ESTER) LÖSEMİ HÜCRE
SERİLERİNDEKİ İLAÇ DİRENCİNE ETKİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Mahmut Sami İNCE

Trabzon-2016

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

CAPE'İN (KAFFEİK ASİT FENETİL ESTER) LÖSEMİ HÜCRE
SERİLERİNDEKİ İLAÇ DİRENCİNE ETKİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Mahmut Sami İNCE

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet Sönmez

Trabzon-2016

ÖZET

CAPE'in Lösemi Hücre Serilerindeki İlaç Direncine Etkisi

Amaç: Akut lösemili hastalarda ilaçlara karşı direnç varlığı veya gelişimi tedavi başarısızlığını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Bal arıları tarafından toplanan reçineli bir madde olan propolis ve etken maddesi kafeik asit fenetil ester (CAPE), antiinflamatuvar, antiviral ve antikanser özellikleri bulunan bir bileşiktir. Bu çalışmada, HL60, K562 ve NB4 lösemi hücre serilerinde CAPE'in hücre serilerine ve ilaç direncine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Materyal-Metod: HL60, K562 ve NB4 hücre serileri azasitidin, desitabin, ara-C ve CAPE ile 37°C'de 4 gün süreyle inkübe edildi. Hücre canlılığındaki değişimler CellTiter-glo lüminesan assay ile değerlendirildi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri student's t-test kullanılarak yapıldı ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

Bulgular: K562, HL-60 ve NB-4 hücre serilerinin ara-C, azasitidin ve desitabin ile inkübasyonu sonrası yapılan canlılık değerlendirmesinde, her üç hücre serisinin ara-C'ye dirençli olduğu, buna karşılık azasitidin ve desitabin'e HL-60 ve NB-4 hücre serisi duyarlı iken K562 hücre serisinin dirençli olduğu gözlemlendi. K562, HL-60 ve NB-4 hücre serilerinde ara-C ve CAPE birlikte kullanımında, tek başına ara-C'ye göre K562 hücre serisinde hücre canlılık oranı %66.30'dan %16.88'e, HL60 hücre serisinde %83.24'ten %10.05'e ve ara-C ile canlılıkta hiç azalma izlenmeyen NB4 hücre serisinde canlılık oranının %42.72'ye gerilediği saptandı ($p < 0.001$). Benzer olarak K562 hücre serisinde CAPE ile desitabin birlikteliğinde tek başına desitabin'e göre hücre canlılık oranının %60.65'den %23.99'a gerilediği izlendi ($p < 0.05$). Azasitidin ve CAPE birlikteliğinde ise hücre canlılık oranlarında değişkenlik saptanmadı.

Sonuç: Sonuç olarak, CAPE'in K562, HL-60 ve NB-4 hücre serilerinde apoptotik, anti-oksidan, MDR gen ve kinaz inhibisyonu veya membran transportuna etkileriyle hücre çoğalmasını engellediği, ilaç direncini düzelttiği, kemoterapik ilaçların etkinliğini artırabileceği ve elde edilen sonuçların ileri araştırmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatine varıldı.

SUMMARY

Effect of CAPE on Drug Resistance in Leukemia Cell Lines

Objectives: Existence or development of drug resistance in patients with acute leukemia is one of major causes affecting the therapeutic failure. A resinous material collected by honey bees propolis, and its active component CAPE have antiinflammatory, antiviral and anticancer properties. In this study, in leukemic cell lines including HL60, K562 and NB4 investigating the effects of CAPE to cell lines and drug resistance was aimed.

Method: HL60, K562 and NB4 cell lines were incubated with azacytidine, decitabine, ara-C and CAPE at 37°C for 4 days. Alteration of cell viability was evaluated using CellTiter-Glo® luminescent assay. Statistical analysis of obtained data was applied using the student t-test and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Findings: Viability assessment of K562, HL60 and NB4 cell lines after incubation with ara-C, azacytidine and decitabine revealed that all three cell lines were resistant against ara-C, whereas HL60 and NB4 cell lines were susceptible to azacytidine and decitabine while K562 cell line was resistant. To compare using ara-C alone and in combination with CAPE in HL60, K562 and NB4 cell lines, the viability diminished from 66.30% to 16.88% in K562 cell line and 83.24% to 10.05% in HL60 cell line respectively, and also the cell viability in NB4 cell line which has no reduction with ara-C decreased to 42.72% ($p < 0.001$). Similarly, CAPE and decitabine concurrence in K562 cell line revealed the viability decrease from 60.65% to 23.99%, as compared to use decitabine alone ($p < 0.05$). There has been no alteration in cell viability when used in combining of azacytidine with CAPE.

Conclusion: As a result, in K562, HL60 and NB4 cell lines CAPE inhibits cell proliferation via its apoptotic, antioxidant effects, as well as by affecting MDR gene, kinase inhibition or membrane transport, reverses the drug-resistance, therefore can increase efficacy of chemotherapeutic agents and we believe the results obtained from our study should be supported by further research.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
SUMMARY	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
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.....	13
2.1.5.5. İmmünofenotipleme	13
2.1.6. Prognostik faktörler	14
2.1.7. Tedavi	16
2.1.8. Relaps ve Dirençli AML Tedavisi	17
2.1.8.1. Relaps ve Tedavi Direncinde Rol Oynayan Faktörler.....	18
2.1.8.2. Dirençli ve Relaps AML Olgularında Tedavi	18
2.1.9. Refrakter ve Relaps AML’de Devam Eden Çalışmalar.....	20
2.2. Propolis ve CAPE.....	21
2.2.1. Propolis	21
2.2.2. CAPE	22

2.2.3. Propolis ve CAPE'in Antitümöral Etkileri	22
3. MATERYAL VE METOD	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Hücre Serileri	24
3.1.2. Kullanılan Cihaz, Teçhizat ve Sarf Malzemeler	24
3.1.3. Kimyasallar	25
3.1.4. Kitler	25
3.2. Metod.....	26
3.2.1. Hücrelerin Çoğaltılması	26
3.2.2. Hücre Sayımı	26
3.2.3. İlaçların İlavesi ve Hücre Canlılık Değerlendirilmesi	26
3.2.4. İstatistiksel Analiz.....	26
4. BULGULAR	27
4.1. Hücre Serilerinde İlaç Dirençlerinin Belirlenmesi	27
4.2. Dirençli Hücre Serilerinde CAPE'in Birlikte Kullanımının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Gösterilmesi	32
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ	40
7. KAYNAKLAR	41

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1. Hücre Serilerinin Farklı Dozlardaki ara-C ile Muamelesi Sonucu Hücre Canlılıklarında Meydana Gelen Değişimin Rölatif Kat Artışı Olarak Gösterilmesi 28
- Şekil 2. Hücre Serilerinin Farklı Dozlardaki Azasitidin ile Muamelesi Sonucu Hücre Canlılıklarında Meydana Gelen Değişimin Rölatif Kat Artışı Olarak Gösterilmesi 29
- Şekil 3. Hücre Serilerinin Farklı Dozlardaki Desitabin ile Muamelesi Sonucu Hücre Canlılıklarında Meydana Gelen Değişimin Rölatif Kat Artışı Olarak Gösterilmesi 30
- Şekil 4. Farklı Dozlarda CAPE' in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi..... 31
- Şekil 5. Azasitidin ve Desitabine Karşı Dirençli Bulunan K562 Hücre Serisinde CAPE Muamelesi İle İlaç Dirençlerindeki Değişimin Gösterilmesi 33
- Şekil 6. K562 Hücre Serisinde ara-C ve CAPE'in Kombine Kullanımının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi..... 33
- Şekil 7. HL-60 Hücre Serisinde ara-C ve CAPE'in Kombine Kullanımının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi..... 34
- Şekil 8. NB-4 Hücre Serisinde ara-C ve CAPE'in Kombine Kullanımının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi..... 35

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
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 Alt tipler ve Genetik Değişimler Arasındaki İlişkiler	12
Tablo 5. AML’de İmmunolojik Fenotipler	14
Tablo 6. AML’de Prognostik Faktörler	15
Tablo 7. AML Tedavisindeki Yeni İlaçların Hedefleri	20
Tablo 8. Hücre Serilerinde Farklı Dozlarda ara-C Muamelesi İle Hücre Canlılığında Gözlenen Değişimin Yüzde Olarak Gösterilmesi	27
Tablo 9. Hücre Serilerinde Farklı Dozlarda Azasitidin Muamelesi ile Hücre Canlılığında Gözlenen Değişimin Yüzde Olarak Gösterilmesi	29
Tablo 10. Hücre Serilerinde Farklı Dozlarda Desitabin Muamelesi ile Hücre Canlılığında Gözlenen Değişimin Yüzde Olarak Gösterilmesi	30
Tablo 11. Hücre Serilerinde Farklı Dozlarda CAPE Muamelesi ile Hücre Canlılığında Gözlenen Değişimin Yüzde Olarak Gösterilmesi	31
Tablo 12. Sitozin Nükleozid Analoglarının ile CAPE Birlikte Kullanımının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	32
Tablo 13. Hücre Serilerinde CAPE ve ara-C Birlikteliğinde Hücre Canlılığında Meydana Gelen Değişimin Yüzde Olarak Gösterilmesi	35

KISALTMALAR LİSTESİ

ABC	: ATP-binding Cassette Transporter
ADE	: Ara-C, Daunorubisin, Etoposid
ALL	: Akut Lenfositik Lösemi
AML	: Akut Myeloid Lösemi
aPTT	: Activated Partial Thromboplastin Time
ara-C	: Sitozin Arabinozid
ara-CTP	: Ara-C-trifosfat
ATCC	: American Type Culture Collection
ATO	: Arsenik Trioxide
ATRA	: All Trans Retinoik Asit
BRCP	: Breast Cancer Resistance Protein
CAPE	: Caffeic Acid Phenethyl Ester
cMPO	: Sitoplazmik Myeloperoksidaz
CN-II	: Sitozolik Nükleotidaz-II
CR	: Komplet Remisyon
CsA	: Siklosporin A
DCK	: Deoksisitidin Kinaz
DİK	: Dissemine İnvasküler Koagülasyon
DNA	: Deoksiribonükleik Asid
DNMT	: DNA Metil Transferaz
DSMZ	: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
ECOG	: Eastern Cooperative Oncology Group
EMA	: Etoposid, Mitoxantron, Ara-C
FAB	: French-American-British
FBS	: Fetal Bovine Serum
FLAG	: Fludarabin, Ara-C, G-CSF
G-CSF	: Granülosit Koloni Stimülan Faktör
Hent-1	: Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1
HLA	: Human Leukocyte Antigen
LAP	: Lökosit Alkalen Fosfataz

LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LRP	: Lung Resistance Protein
MDR	: Multidrug Resistance
MDS	: Myelodisplastik Sendrom
MPO	: Myeloperoksidaz
MRP	: MDR Related Protein
NFkB	: Nükleer Faktör kappa B
nM	: Nanomolar
NSE	: Nöron Spesifik Enolaz
PAS	: Periodik Acid Schiff
P-gp	: P-glikoprotein
PT	: Protrombin Time
RAEB-t	: Refractory Anemia with Excess Blast Transformation
RI	: Remisyon İndüksiyon
RNA	: Ribonükleik Asid
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SBB	: Sudan Black B
SSS	: Santral Sinir Sistemi
UCK-2	: Uridine Cytidine Kinase 2
VEGF	: Vascular Enthotelial Growth Factor
WHO	: World Health Organization
YDAC	: Yüksek Doz Ara-C
μ M	: Micromolar

1. GİRİŞ

Akut myeloid lösemi (AML) hematopoez sürecinde farklılaşmanın durup, proliferasyonun artmasına bağlı olarak blastik hücre popülasyonunun çoğalmasıyla karakterize bir kök hücre hastalığıdır. Hematopoetik hücrelerdeki bu malign değişim, fonksiyon kaybına neden olmakta ve tedavi edilmezse haftalar ve aylar içinde ölüme sonuçlanmaktadır. Son yıllarda AML tedavisindeki gelişmeler sonucunda özellikle genç AML'li hastalarda %70-80 oranında tam remisyona sağlanmakla birlikte, ileri yaş hastalarda remisyona oranlarının halen düşük olduğu görülmektedir (1, 2).

Çoklu ilaç direnci [multidrug resistance (MDR)] AML'li hastalarda tedaviye yanıtızlık ve relapsta rol oynabilen en önemli faktörlerden birisidir. Özellikle MDR1 geninin kodladığı bir eflüks pompa proteini olan P glikoprotein (P-gp), MDR ilişkili protein [MDR related protein (MRP)], akciğer direnç proteini [Lung resistance protein (LRP)] ve meme kanseri direnç proteini [Breast cancer resistance protein (BCRP)] hücre içine giren ilaçların dışarıya atılmasına sebep olmaktadır. Ayrıca topoizomera ve glutatyon sentetaz enzim aktivitelerinde ve apoptozis direnç genlerinden özellikle bcl-2 gen aktivitesindeki artış lösemik hücrelerde sitotoksitaya karşı direnci artırabilmektedir (3).

Propolis, çeşitli bitki kaynaklarından bal arıları tarafından toplanan reçineli bir maddenin genel adıdır. Kafeik asit fenetil ester [caffeic acid phenethyl ester (CAPE)], propolisin biyolojik olarak aktif bileşenlerinden biri olmakla birlikte antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral ve antikanser özellikleri bulunan bir bileşiktir. HeLa, HL-60 ve MCF-7 hücre serilerinde kimyasal karsinojenler ile hücre kültürü çalışmaları yapılmış ve CAPE'in oksidatif mekanizmalar üzerinden etki eden kanser önleyici bir madde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca promyelositik bir lösemi hücre hattı olan HL-60 hücrelerinde CAPE'in bcl-2 down-regülasyonuna, bax up-regülasyonuna, kaspaz-3 aktivasyonuna neden olarak apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (4-9).

Bu çalışmada; HL60, K562 ve NB4 lösemi hücre serilerinde anti-tümör, anti-inflamatuar, antineoplastik ve antioksidan özelliklerinin olduğu bilinen CAPE'in hücre serilerine ve ilaç direncine etkilerinin 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 infeksiyonlara eğilimi artırmaktadır (1).

2.1.1. Epidemiyoloji

Akut myeloid lösemi erişkinlerde görülen akut lösemilerin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. AML çocukluk döneminde daha az görülmekte ve 15 yaş altındaki akut lösemilerin %15-20'sini oluşturmaktadır. AML her yaşta görülmekle beraber genel olarak ileri yaş hastalığıdır ve ortalama görülme yaşı 65'tir. AML'nin yıllık görülme insidansı 3.7/100.000 olup; insidans yaşla birlikte artmakta ve 65 yaş altında 1.8/100.000 iken, 65 yaş üzerinde 17/100.000'e ulaşmaktadır. AML erkeklerde 4.6/100.000, kadınlarda 3/100.000 olarak izlenmektedir (10-14).

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) (15-21).

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 hemoglobinopati

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 hastalığı

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 immünojenetik fenotip arasındaki ilişki zayıf olarak izlenmektedir (22).

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 (23, 24).

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 ayırında immünofenotipleme 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 pozitiftir. İmmünofenotiplemede 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. İmmünofenotiplemede 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. İmmünofenotiplemede 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. İmmünofenotiplemede 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 güçlükle aspire edilebilmektedir.

2.1.3.2. WHO Sınıflaması

WHO sınıflamasında morfoloji, sitogenetik, moleküler genetik ve immünolojik özelliklere dayanarak, universal olarak prognostik açıdan

kullanılabilecek 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 (23-25).

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 Myelofibroza 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 başvurmaktadırlar (26).

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 (27).

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, hiperlökositöz 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 dermatöz) ve piyoderma gangrenosum gibi benign seyirli cilt lezyonları da görülebilmektedir. Bu lezyonlar ağrılı olup genellikle steroide cevap vermektedirler. 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 (28-32).

2.1.5. Laboratuvar Bulguları

2.1.5.1. Periferik Kan Bulguları

Akut myeloid lösemi hastalarında kemik iliğinde üretimin azalması ve eritrositlerin yaşam süresinin kısalmasına bağlı olarak anemi gelişebilmektedir. Anemi genellikle normokrom normositer olup, değişik 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 kısalmasına bağlı olarak genellikle trombositopeni bulunabilmektedir. Tanı sırasında hastaların yaklaşık %75'inde trombosit sayısı $100.000/mm^3$ 'ün, yaklaşık %25'inde ise $25.000/mm^3$ '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 5 ve 8), PT ve aPTT uzaması, sızıntı tarzı kanama ve trombositopeni ile seyredebilmektedir (33, 34).

Akut myeloid lösemi hastalarında lökosit sayısı değişkenlik göstermektedir. Tanı sırasında ortalama lökosit sayısı $15.000/mm^3$ 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 bağlı MPO, SBB ve LAP aktivitesi değişkenlik göstermektedir. AML hastalarının büyük çoğunluğunda (%95) periferik yaymada blast tespit edilebilmektedir. Blastlar periferik yaymada kolayca tanınabilmekte ancak bazen myelodisplazik değişiklikler gözlenebilmektedir. AML'de blastların boyutları ve sitoplazmik granül sayısı değişken olup nükleusları düzensiz olarak izlenmektedir. Blast sitoplazmasında azurofilik granüllerden oluşan ve myeloblastlar için patognomik olan auer rod görülme sıklığı AML alt tipine göre değişebilmektedir (35, 36).

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 vermektedirler. Kemik iliği fibrozisi AML'nin tüm alt tiplerinde değişik oranlarda olup özellikle megakaryoblastik lösemide daha belirgin olarak izlenmektedir (37).

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 (38, 39). 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 (25).

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 (40-42). 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 (38). 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 dişeti 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 (40-45). 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 (46-50). FAB alt tiplerinde görülen anomaliler ve translokasyonlar ile bunların karşılığı moleküler değişiklikler Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4. AML'de Morfolojik Alt tipler ve Genetik Değişimler Arasındaki İlişkiler

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 (51).

2.1.5.5. İmmüfenotipleme

Akut lösemilerin sınıflamasında hücre yüzey antijenleri ile reaksiyona giren monoklonal antikolar 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 (52-55).

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 (56).

Tablo 6. AML’de Prognostik Faktörler

Faktör	İyi	Kötü
Klinik		
Yaş	< 45 yaş	< 2 yaş, > 60 yaş
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 hastalıksız 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 (57-59).

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 hastalıksız sağkalım süresi, hem de tam remisyon oranı daha düşük olmaktadır (60).

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 otolog veya allojeneik kemik iliği transplantasyonunun kemoterapiye üstünlüğü yoktur. 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 otolog kök hücre transplantasyonu veya 3-4 siklus YDAC uygulaması diğer tedavi seçenekleridir. Kötü risk sitogenetik grubundaki AML hastalarına ise HLA uyumlu kardeş vericiden veya akraba dışı donörden allojeneik kök hücre nakli önerilen tavadir. Allojeneik kök hücre nakli şansı olmayan hastalar 1-2 siklus YDAC sonrası otolog kemik iliği nakli ya da klinik araştırma protokollerine yönlendirilmelidirler (61-64).

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 (65).

AML-M3 hastalarında indüksiyon 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 (66).

2.1.8. Relaps ve Dirençli AML Tedavisi

Son 10 yılda tedavideki gelişmeleri takiben AML'de remisyon oranları %60-80'e, 5 yıllık yaşam süreleri %40'ların üzerine çıkmıştır (67). Bu düzelmeye hasta riskinin belirlenerek uygun tedavi rejimlerinin seçilmesi ve yoğun kemoterapi programlarının iyi bir destek tedavi ile birlikte olmasının rolü büyük olmuştur. Komplet remisyona (CR) giren olguların %50'sinin relaps yapması, bu relapsın da %60'ının ilk 1 yılda karşımıza çıkması ve ilk tedavilerinde remisyona girmeyen olguların varlığı önemli bir sorundur. Çünkü bu hastaların bugün için 2 yıllık yaşam süreleri %20 dolayındadır (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; özellikle MDR1 geninin kodladığı bir eflüks pompa proteini olan P-gp, MRP, LRP ve BCRP hücre içine giren ilaçların dışarıya hızla atıldığı bir ortam yaratmaktadırlar. Ayrıca topoizomerez 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 (3).

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 2 yıllık yaşam oranı %20 dolaylarında olup, 2 yıllık en yüksek yaşam süresi çocuklarda %35 ve iyi risk grubundaki çoğu genç olgularda %38 oranındadır (67, 68).

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 (69, 70). 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 rejiminde 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 (71-77). 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 (78-80).

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 (81).

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 (81).

2.1.9. Refrakter ve Relaps AML’de Devam Eden Çalışmalar

Yukarıda tartışılan kemoterapilerin hâlâ tam remisyon oranları ve hastalısız sağkalım üzerine etkisinin kısıtlı olması yeni tedavileri gündeme getirmiştir (tablo 7) (82).

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 İlaç Direncini Etkileyen İlaçlar

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 (83). Valdospar'ın 60 yaşın üzerindeki hastalarda ara-C, daunorubisin, etoposid kombinasyonuna eklendiği CALGB çalışmasında toksisite nedeniyle çalışma sonlandırılmıştır (84). Ancak 60 yaşın altındaki relaps ve refrakter olgularda EMA rejiminin etkinliğini artırabileceği rapor edilmiştir (85). 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, hastalıksız yaşam süresi ve genel yaşam süresinin anlamlı olarak arttığı rapor edilmiştir (86). 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 (87). 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 (79). Bu alanda CsA ve valdospardan farklı LY-335979, VX710, VX-853 gibi yeni ilaçlar da üretilmiş olup çalışmalar devam etmektedir (83).

2.2. Propolis ve CAPE

2.2.1 Propolis

Bal arılarının çeşitli bitkilerden topladığı özütlerle reçinemsî 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, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan ve antitümöral etkileri gösterilmiştir (88-93).

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, antiinflamatuvar, antiviral, immün uyarıcı, karsinostatik ve antikanser özellikleri bulunan bir bileşiktir (4, 5). Çok uzun aromatik ve alifatik yapıda karbon grupları taşıdığı için aynı zamanda lipofilik özelliindedir. Böylelikle, hücre membranından kolayca geçmesi mümkün olmaktadır (94).

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 (95). Yapılan çalışmalarda propolisin antitümöral bir etki gösterdiği izlenmiştir. HCT-116 (kolorektal kanser hücre serisi) ile in vivo tümör oluşturulan farelerde, propolisin oral yolla alımının toksisite oluşturmadığı ve tümör kitlesindeki mitotik hücre oranının azaldığı gösterilmiştir (96). 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 apoptozise yol açtığı izlenmiş; 3 hücre hattından 1’inde propolisin radyoterapiye karşı duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (97). Propolis ekstraktlarının spesifik olarak apoptozise 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 (98).

Yapılan pek çok araştırma; CAPE'in tümör hücreleri üzerindeki öldürücü etkisinin sitotoksik olarak değil; apoptozisi 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 artmış olarak bilinen NF- κ B (nükleer faktör kappa B)'yi inhibe ettiği bildirilmiştir. CAPE'in tümör hücrelerinde kemoterapi ve radyoterapiye karşı hassasiyet oluşturarak tedavinin etkinliğini arttırdığı, bunun yanında CAPE'in kanser hücreleri üzerinde seçici antitümöral etkiler gösterdiği de literatürde yer almaktadır (99-107).

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 siklusu 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 (108).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Çalışma için 04.06.2015 tarihli, 2015/54 no.lu Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu onayı alındı. Çalışmada kullanılacak olan HL-60 (ATCC[®], CCL-155[™]), NB4 (DSMZ[®]-207) ve K562 (ATCC[®], CCL-243[™]) hücre serileri Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hematoloji Bilim Dalı'ndan temin edildi.

3.1.1. Hücre Serileri

- **HL60:** Akut promyelositik lösemili hastadan elde edilen HL-60 hücre serisi in vitro olarak farklılaşabilme özelliğine sahip olup; c-myc, K-ras ve p53 gibi hücrel onkojenleri içeren özel genomik mutasyonlara sahiptir. HL60 hücre serisinin promyelositik olarak adlandırılmasına ve retinoik asit yanıtına rağmen, maturasyonlu bir akut myeloblastik lösemiden derive olduğu kabul edilmektedir (109-112).
- **NB4:** İnsan promyelositik lösemi derivesi olan NB4 hücre serisi retinoik asit ilavesiyle granülositik maturasyon gösterir ve promyelositik lösemi kromozomal translokasyonu olan t(15;17) eksprese eder (111, 112).
- **K562:** K562 hücreleri kronik myeloid lösemisinin blastik kriz evresinden kaynaklanan myeloid dizi hücre serileridir. Philadelphia kromozomu pozitif olup, K562 hücrelerinde normal kromozom sayısının yaklaşık 1,5 katı kromozom bulunmaktadır. Bcr/abl füzyon geni ekspresyonu nedeniyle apoptozise karşı dirençlidirler (113-115).

3.1.2. Kullanılan Cihaz, Teçhizat ve Sarf Malzemeler

Adı/Modeli	Projede Kullanım Amacı
Etüv (Heraeus, Almanya)	Hücre kültürü ve inkübasyon işlemleri
Buzdolabı (Bosch, Türkiye)	Kimyasalların saklanması
Derin dondurucu (-20) (Bosch, Türkiye)	Kimyasalların saklanması

- 80 Dondurucu (Thermo Scientific, ABD)	Hücre saklanması
Laminar flow Class II (Metisafe, Türkiye)	Hücre kültürü
Pastör fırını (Nüve, Türkiye)	Sterilizasyon
PipetAid (Gilson, ABD)	Hücre kültürü
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj (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
10ml enjektör (Ayset, Türkiye)	Hücre kültürü
96 well plates (Clear bottom)	Hücre canlılığı

3.1.3. Kimyasallar

CAPE	Sigma Aldrich, C8221
Azasitidin	Vidaza®
Desitabin	Dacogen®
Sitarabin (ara-C)	Cytarabine®
Penisilin-Streptomisin	Invitrogen, 15140-148
RPMI 1640	Invitrogen, 21875-034
FBS	Invitrogen, 10270-098

3.1.4. Kitler

Adı	Projede kullanım amacı
Cell Titer Glo® Luminescent cell viability assay	Hücre canlılığı

3.2. Metod

3.2.1. Hücrelerin Çoğaltılması

HL60, K562 ve NB4 hücreleri 37°C⁰'de %5 CO₂'li inkübatörde %10 fetal bovine serum, %1 L-glutamat, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri kullanılarak çoğaltıldı.

3.2.2. Hücre Sayımı

5 ml hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılarak, pellet 3 ml besiyerinde resüspanse edildi. Takiben hücre süspansiyonundan 50 mikrolitre eppendorf tüplerine 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. İlaçların İlavesi ve Hücre Canlılık Değerlendirilmesi

25000 hücre/ml konsantrasyonda hücre süspansiyonu hazırlandıktan sonra, opak duvarlı 96-well plate'e ekildi; üzerilerine azasitidin, desitabin, ara-C ve CAPE farklı dozlarda ilave edilip, 37°C'de 4 gün inkübe edildikten sonra; üzerilerine 50 uL CellTiter Glo solüsyonu eklenerek oda ısısında 5 dakika inkübe edildi ve takiben CellTiter GLo lüminasans assay (ATP testi) ile üretici firmanın direktifleri doğrultusunda plate reader'da değerleri okunarak hücre canlılığı çalışıldı.

3.2.4. İstatistiksel analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri Graphpad Prism V6 programı ile student's t-test kullanılarak yapıldı ve p<0,05 anlamlı kabul edildi.

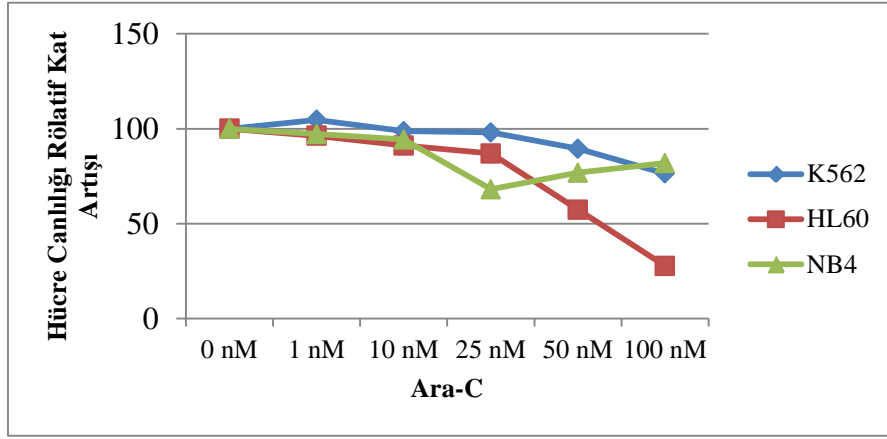
4. BULGULAR

4.1. Hücre Serilerinde İlaç Dirençlerinin Belirlenmesi

İlk aşamada deoksisitidin analogu sitarabin (ara-C) ile K562, HL60 ve NB4 lösemi hücre serilerinde hücre canlılığının nasıl etkilendiği tespit edildi. 1 nM dozunda K562 hücre serisinde canlılıkta azalma gözlenmezken, HL60 hücre serisinde hücre canlılığı %96.27, NB4 hücre serisinde %97.16 olarak tespit edildi. 10 nM dozunda K562 hücre serisinde canlılık %98.68, HL60 hücre serisinde %91.14, NB4 hücre serisinde %94.33 idi. 25 nM dozunda K562 hücre serisinde canlılık %97.99, HL60 hücre serisinde %86.94, NB4 hücre serisinde %68.14 olarak saptandı. 50 nM dozunda K562 hücre serisinde canlılık %89.45, HL60 hücre serisinde %57.39, NB4 hücre serisinde %76.89 olarak tespit edildi. 100 nM dozunda ise K562 hücre serisinde canlılık %76.40, HL60 hücre serisinde %27.81, NB4 hücre serisinde %81.86 olarak izlendi (Tablo 8). Bu bulgular ışığında hücre canlılığında meydana gelen değişim rölatif kat artışı olarak hesaplandığında, K562 hücre serisinde daha belirgin olmak üzere her üç hücre serisi ara-C'ye karşı dirençli bulundu (Şekil 1).

Tablo 8. Hücre Serilerinde Farklı Dozlarda Ara-C Muamelesi İle Hücre Canlılığında Gözlenen Değişimin Yüzde Olarak Gösterilmesi

Ara-C Konsantrasyonu	Hücre Hatları		
	% Canlılık \pm SD (Standart Sapma)		
	K562	HL60	NB4
0 nM	100 \pm 3.57	100.00 \pm 12.09	100 \pm 21.86
1 nM	104.64 \pm 10.08	96.27 \pm 38.24	97.16 \pm 2.69
10 nM	98.68 \pm 14.39	91.14 \pm 30.88	94.33 \pm 3.97
25 nM	97.99 \pm 0.71	86.94 \pm 6.66	68.14 \pm 12.42
50 nM	89.45 \pm 5.30	57.39 \pm 6.09	76.89 \pm 10.47
100 nM	76.40 \pm 4.03	27.81 \pm 3.06	81.86 \pm 20.14

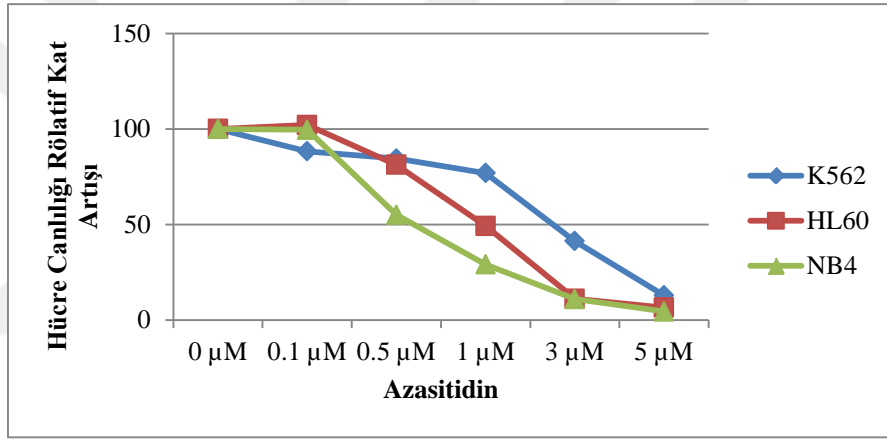


Şekil 1. Hücre Serilerinin Farklı Dozlardaki Ara-C ile Muamelesi Sonucu Hücre Canlılıklarında Meydana Gelen Değişimin Rölatif Kat Artışı Olarak Gösterilmesi

Hücreler sitozin nükleozid analogu azasitidin ile muamele edildiklerinde ise 0.1 μM dozunda HL60 hücre serisinde hücre canlılığında azalma gözlenmezken, K562 hücre serisinde canlılık %88.34, NB4 hücre serisinde %99.63 olarak tespit edildi. 0.5 μM dozunda K562 hücre serisinde canlılık %84.56, HL60 hücre serisinde %81.32, NB4 hücre serisinde %55.20 idi. 1 μM dozunda K562 hücre serisinde canlılık %77.01, HL60 hücre serisinde %49.29, NB4 hücre serisinde %29.20 olarak saptandı. 3 μM dozunda K562 hücre serisinde canlılık %41.37, HL60 hücre serisinde %11.25, NB4 hücre serisinde %11.09 olarak izlendi. 5 μM dozunda ise K562 hücre serisinde canlılık %12.98, HL60 hücre serisinde %6.6, NB4 hücre serisinde %4.54 olarak tespit edildi (Tablo 9). Ara-C ile elde edilen sonuçlarla benzer olarak K562 hücre serisinin NB4 ve HL60 hücre serileri ile karşılaştırıldığında bu ilaca daha dirençli olduğu tespit edildi (Şekil 2).

Tablo 9. Hücre Serilerinde Farklı Dozlarda Azasitidin Muamelesi İle Hücre Canlılığında Gözlenen Değişimin Yüzde Olarak Gösterilmesi

Azasitidin Konsantrasyonu	Hücre Hatları % Canlılık \pm SD		
	K562	HL60	NB4
0 μ M	100 \pm 8.97	100 \pm 1.27	100 \pm 47.34
0.1 μ M	88.34 \pm 1.56	102.14 \pm 13.07	99.63 \pm 60.86
0.5 μ M	84.56 \pm 8.67	81.32 \pm 21.59	55.20 \pm 26.06
1 μ M	77.01 \pm 7.73	49.29 \pm 6.10	29.20 \pm 8.39
3 μ M	41.37 \pm 12.45	11.25 \pm 1.21	11.09 \pm 2.45
5 μ M	12.98 \pm 3.71	6.60 \pm 0.48	4.54 \pm 0.57



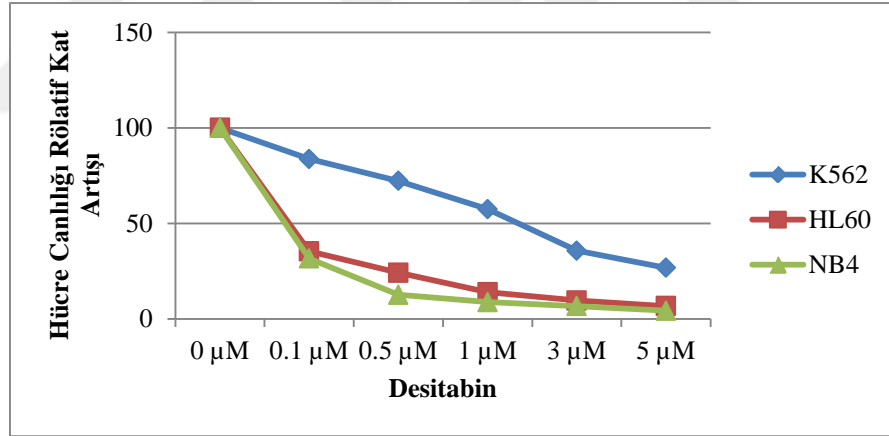
Şekil 2. Hücre Serilerinin Farklı Dozlardaki Azasitidin ile Muamelesi Sonucu Hücre Canlılıklarında Meydana Gelen Değişimin Rölatif Kat Artışı Olarak Gösterilmesi

Hücreler bir diğer sitozin nükleozid analogu desitabin ile muamele edildiklerinde 0.1 μ M dozunda hücre canlılığı K562 hücre serisinde %83.73, HL60 hücre serisinde %35.49, NB4 hücre serisinde %31.70 olarak tespit edildi. 0.5 μ M dozunda K562 hücre serisinde canlılık %72.30, HL60 hücre serisinde %24.26, NB4 hücre serisinde %12.71 idi. 1 μ M dozunda K562 hücre serisinde canlılık %57.49, HL60 hücre serisinde %14.06, NB4 hücre serisinde %8.89 olarak saptandı. 3 μ M dozunda K562 hücre serisinde canlılık %35.81, HL60 hücre serisinde %9.75, NB4 hücre serisinde %6.84 olarak izlendi. 5 μ M dozunda ise K562 hücre serisinde canlılık %26.82, HL60 hücre serisinde %6.84, NB4 hücre serisinde %4.34 olarak saptandı (Tablo 10). Bu bulgular ışığında azasitidin muamelesinde olduğu gibi

hücrelerin düşük dozlarda (0.1 μM) desitabin muamelesi ile HL-60 ve NB-4 hücre serilerinde %50'den fazla azalma olduğu, K562 hücre serisinin ise bu ilaca karşı dirençli olduğu bulundu (Şekil 3).

Tablo 10. Hücre Serilerinde Farklı Dozlarda Desitabin Muamelesi ile Hücre Canlılığında Gözlenen Değişimin Yüzde Olarak Gösterilmesi

Desitabin Konsantrasyonu	Hücre Hatları % Canlılık \pm SD		
	K562	HL60	NB4
0 μM	100.00 \pm 16.77	100.00 \pm 14.96	100.00 \pm 11.68
0.1 μM	83.73 \pm 20.15	35.49 \pm 10.41	31.70 \pm 6.98
0.5 μM	72.30 \pm 10.98	24.26 \pm 1.97	12.71 \pm 4.10
1 μM	57.49 \pm 17.79	14.06 \pm 4.11	8.89 \pm 2.56
3 μM	35.81 \pm 12.47	9.75 \pm 1.88	6.84 \pm 1.34
5 μM	26.82 \pm 6.91	6.84 \pm 0.55	4.34 \pm 0.47



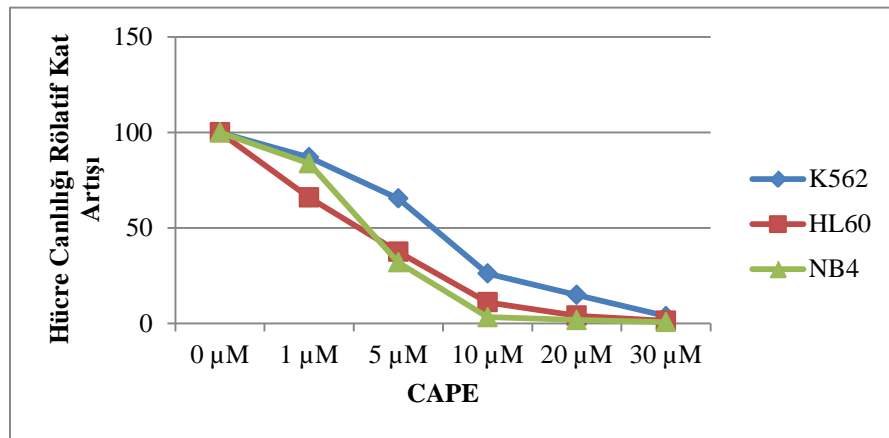
Şekil 3. Hücre Serilerinin Farklı Dozlardaki Desitabin ile Muamelesi Sonucu Hücre Canlılıklarında Meydana Gelen Değişimin Rölatif Kat Artışı Olarak Gösterilmesi

CAPE ile 1 μM konsantrasyonda hücre canlılığı K562 hücre serisinde %87.03, HL60 hücre serisinde %65.98, NB4 hücre serisinde %83.86 olarak tespit edildi. 5 μM konsantrasyonda hücre canlılığı K562 hücre serisinde %65.41, HL60 hücre serisinde %37.54, NB4 hücre serisinde %32.01 idi. 10 μM konsantrasyonda hücre canlılığı K562 hücre serisinde %26.21, HL60 hücre serisinde %11.14, NB4 hücre serisinde %3.41 olarak saptandı. 20 μM konsantrasyonda hücre canlılığı K562

hücre serisinde %14.97, HL60 hücre serisinde %4.13, NB4 hücre serisinde %1.89 olarak izlendi. 30 μM konsantrasyonda ise hücre canlılığı K562 hücre serisinde %3.90, HL60 hücre serisinde %1.49, NB4 hücre serisinde %0.82 olarak tespit edildi (Tablo 11). Bu bulgular ışığında HL-60 ve NB-4 hücre serileri için hücrelerin %50'den fazlasını öldüren CAPE dozunun 5 μM olduğu tespit edildi. K562 hücre serisinde ise hücrelerin %50'sinden daha fazlasını öldürebilen CAPE dozunun bu dozdan daha fazla miktarda (10 μM 'dan az, yaklaşık 7-8 μM ; şekil 4) olduğu belirlendi. Konvansiyonel tedavi ajanları ile birlikte kombine kullanılacak olması nedeniyle sadece CAPE ile tüm hücreleri öldürmeden ilaç kombinasyonlarının etkinliğini görebilmek için CAPE miktarının 5 μM konsantrasyonun yeterli olacağı kabul edildi.

Tablo 11. Hücre Serilerinde Farklı Dozlarda CAPE Muamelesi ile Hücre Canlılığında Gözlenen Değişimin Yüzde Olarak Gösterilmesi

CAPE Konsantrasyonu	Hücre Hatları % Canlılık \pm SD		
	K562	HL60	NB4
0 μM	100 \pm 23.75	100 \pm 7.86	100 \pm 45.71
1 μM	87.03 \pm 13.25	65.98 \pm 16.82	83.86 \pm 19.01
5 μM	65.41 \pm 10.45	37.54 \pm 4.87	32.01 \pm 0.79
10 μM	26.21 \pm 5.68	11.14 \pm 1.62	3.41 \pm 0.14
20 μM	14.97 \pm 0.96	4.13 \pm 0.07	1.89 \pm 0.68
30 μM	3.90 \pm 0.19	1.49 \pm 0.23	0.82 \pm 0.08



Şekil 4: Farklı Dozlarda CAPE'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

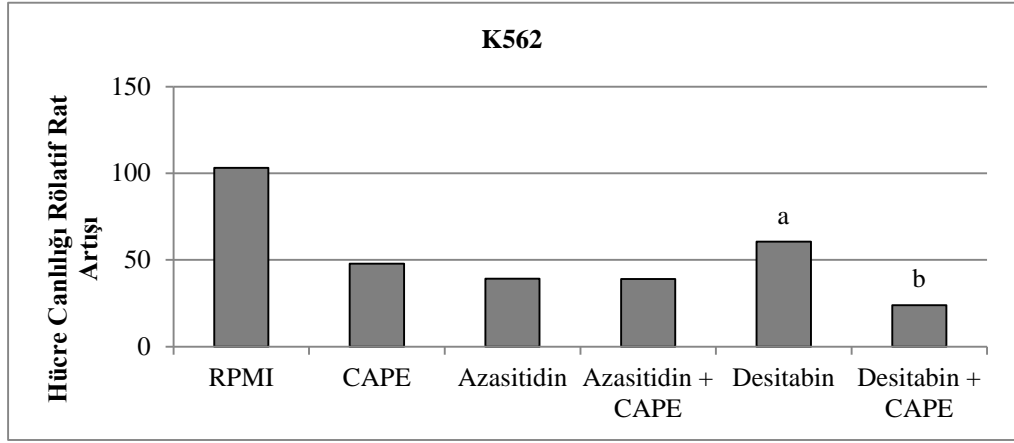
4.2. Dirençli Hücre Serilerinde CAPE'in Birlikte Kullanımının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Gösterilmesi

K562 hücre serisi 1 μ M desitabin, 1 μ M azasitidin, 5 μ M CAPE ve desitabin+CAPE ve azasitidin+CAPE kombinasyonu ile 4 gün süreyle muamele edildi. 4. günün sonunda K562 hücre serisinde hücre canlılığı CAPE ile %47.88, azasitidin ile %39.23, desitabin ile ise %60.65 olarak bulundu. Azasitidin ile CAPE kombine kullanıldığında hücre canlılığında değişme olmadığı (yaklaşık %39), desitabin ve CAPE kombine uygulandığında ise hücre canlılığının %23.99'a gerilediği tespit edildi (Tablo 12). Desitabin ile CAPE'in kombine kullanımının sadece desitabin kullanımı ile karşılaştırıldığında hücreleri daha fazla öldürdüğü ve bu bulgunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$) (Şekil 5).

Tablo 12. Sitozin Nükleozid Analogları ile CAPE'in Birlikte Kullanımının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

	K562 Hücre Hattı
	% Canlılık \pm SD
RPMI	103.07 \pm 5.74
CAPE (5 μ M)	47.88 \pm 3.29
Azasitidin (1 μ M)	39.23 \pm 14.46
Azasitidin + CAPE	38.99 \pm 7.69
Desitabin (1 μ M)	60.65 \pm 1.20 ^a
Desitabin + CAPE	23.99 \pm 3.44 ^b

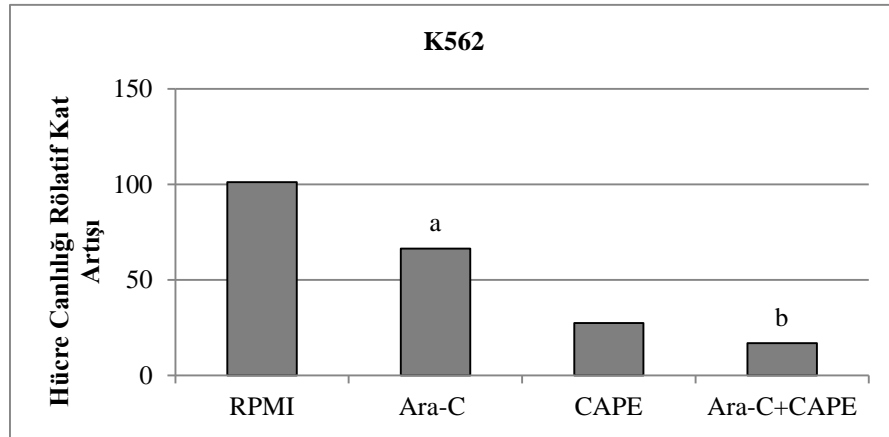
a-b: $p<0.05$



a-b: $p < 0.05$

Şekil 5. Azasitidin ve Desitabine Karşı Dirençli Bulunan K562 Hücre Serisinde CAPE Muamelesi ile İlaç Dirençlerindeki Değişimin Gösterilmesi

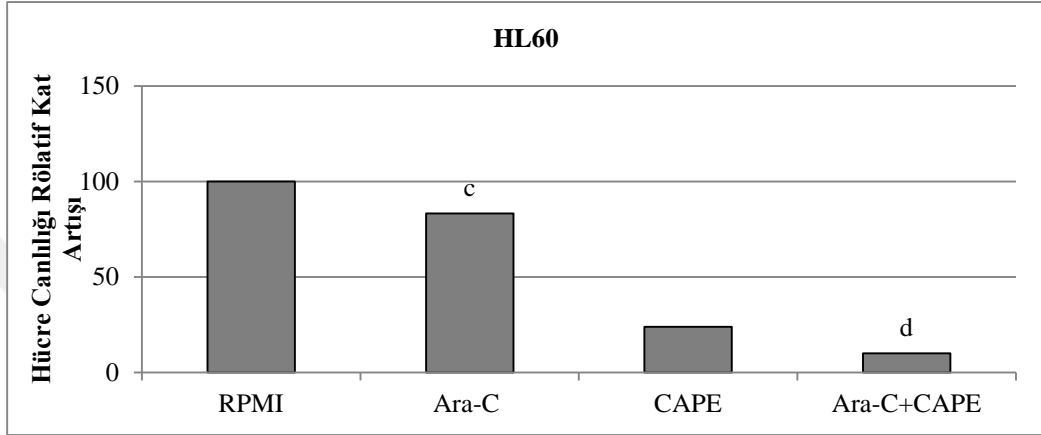
Ara-C'ye dirençli her üç hücre serisi, 5 nM ara-C ve 5 μ M CAPE ile 4 gün süreyle inkübe edildi ve 4. günün sonunda hücre canlılık testi yapıldı. K562 hücre serisinde ara-C ile hücre canlılığı %66.30 iken, CAPE muamelesi ile %27.44 olarak bulundu. Ara-C ve CAPE kombine uygulandığında ise hücre canlılığı %16.88 olarak tespit edildi (Tablo 13). Bu bulgu K562 hücre serisinde tek başına ara-C muamelesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.01$) (Şekil 6).



a-b: $p < 0,001$

Şekil 6. K562 Hücre Serisinde Ara-C ve CAPE'in Kombine Kullanımının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

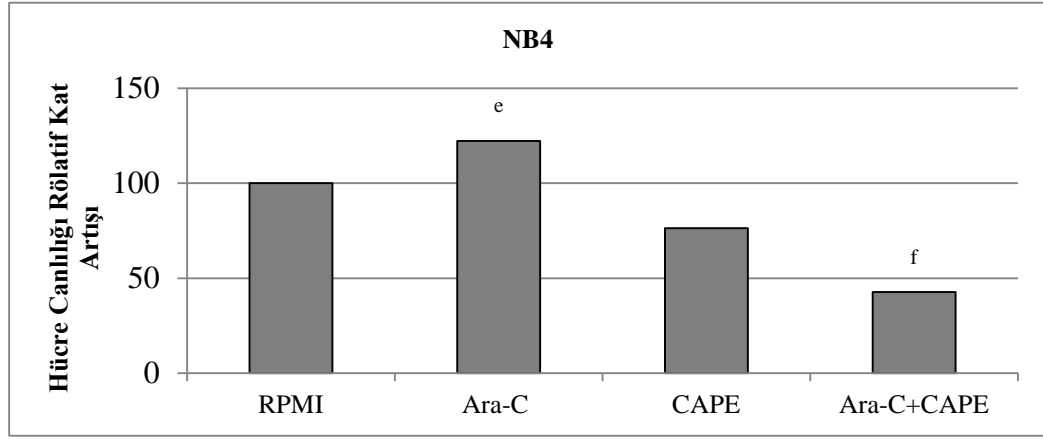
Ara-C'ye dirençli olduğu tespit edilen bir başka hücre serisi HL60 serisinde tek başına ara-C ile canlılık %83.24 iken, tek başına CAPE ile %23.91 olarak bulundu. Ara-C ve CAPE kombine uygulandığında ise hücre canlılığı %10.05 olarak tespit edildi (Tablo 13). Bu bulgu HL60 hücre serisinde tek başına ara-C uygulaması ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$) (Şekil 7).



c-d: $p<0,001$

Şekil 7. HL-60 Hücre Serisinde Ara-C ve CAPE'in Kombine Kullanımının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Ara-C'ye dirençli bulunan bir diğer hücre serisi NB4 serisinde tek başına ara-C muamelesi ile hücre canlılığında azalma izlenmezken, tek başına CAPE muamelesi ile hücre canlılığı %76.28 olarak bulundu. Ara-C ve CAPE kombine uygulamasında ise hücre canlılığı %42.72 olarak tespit edildi (Tablo 13). Bu bulgu NB4 hücre serisinde tek başına ara-C ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$; Şekil 8).



e-f: p<0.05

Şekil 8. NB-4 Hücre Serisinde Ara-C ve CAPE'in Kombine Kullanımının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Tablo 13. Hücre Serilerinde CAPE ve Ara-C Birlikteliğinde Hücre Canlılığında Meydana Gelen Değişimin Yüzde Olarak Gösterilmesi

	Hücre Hatları % Canlılık ± SD		
	K562	HL60	NB4
RPMI	101.15±4.51	100.00±10.16	100.04±18.73
Ara-C (25 nM)	66.30±1.27 ^a	83.24±13.09 ^c	122.25±31.7 ^e
CAPE (5 µM)	27.44±2.54	23.91±1.52	76.28±5.18
Ara-C+CAPE	16.88±3.62 ^b	10.05±1.55 ^d	42.72±5.05 ^f

a-b, c-d: p<0.001; e-f: p<0.05

5. TARTIŞMA

Farklılaşma özelliklerini kaybetmiş, genetik veya epigenetik değişikliklere sahip olan blastik hücrelerin kan, kemik iliği ve diğer dokularda birikimi ile karakterize hematolojik bir malignensi olan AML’de tedaviye rağmen genç erişkin hastaların yaklaşık %30’unda, yaşlı hastaların %50’sinde tedaviye yanıtızsızlık mevcuttur (1, 2). Goldie JH. ve arkadaşları AML’li hastalarda dirençli hücrelerin tanıdan itibaren varolduğunu, tedaviye duyarlı hücrelerin ortadan kalkmasıyla çoğaldıklarını ve baskın hale geldiklerini göstermişlerdir (116). Hastaların tedaviye yanıtızsızlık oranını veya yeterli olmayan yanıtını etkileyen hasta ve hastalık ilişkili birçok faktör olmakla birlikte kullanılan ilaçlara karşı direnç varlığı tedavi başarısızlığını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir (3, 117).

Deoksisitidin analogu sitarabin (ara-C; 1-β-D-arabinofuranosilsitosinin) AML tedavisinde en sık kullanılan ilaçlardan birisi olup, DNA polimerazı inhibe ederek veya yeni sentezlenmiş DNA’ya bağlandıktan sonra zincirin uzamasını sonlandırarak etki göstermektedir (118). Ara-C’ye karşı direncin en sık sebebinin molekülün intrasellüler aktif metaboliti olan ara-CTP (ara-C-trifosfat) miktarını azaltan faktörlerin olduğu belirtilmesine rağmen, bu durum direnç gelişim mekanizmasını tam olarak açıklayamamaktadır. Nitekim, yapılan bir çalışmada HL-60 ve K562 hücre serilerinin de içinde bulunduğu beş farklı hücre dizisinde ara-C dirençli subklonlar tespit edilmiş ve bunlarda ara-C membran transport kapasitesi, ara-C’nin fosforile edilmesinde hız kısıtlayıcı enzim olan deoksisitidin kinaz (DCK) ve defosforilasyonda görevli enzim sitozolik nükleotidaz-II (CN-II) aktivitesinde değişiklikler gözlenmiştir (119). Sonuç olarak, ara-C’nin lösemi hücresine girmesini sağlayan membran transportu hENT1’in (Human equilibrative nucleoside transporter-1) ve DCK aktivitesinin azalması, artmış CN-II aktivitesi ara-C’ye direnç gelişiminden sorumlu olan faktörler olarak tanımlanmışlardır.

Son yıllarda sitozin nükleotid analogları azasitidin ve desitabin AML tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve özellikle yoğun tedavi alamayacak hastalarda mortalite ve morbiditeyi azaltabileceği gösterilmiştir. Düşük dozlarda uygulandıklarında yeni sentezlenmiş DNA ile birleştikten sonra DNA metiltransferaz’a irreversibl bağlanarak genomik DNA metilasyonunu azaltırlar.

Azalan metilasyona bağlı olarak inaktif olan tümör süpresör genlerin aktivasyonu bu ilaçların etkisinde önemli rol oynarlar (120-122).

Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu olarak K562, HL-60 ve NB-4 hücre serilerinin ara-C'ye karşı dirençli olduğunu saptadık. Özellikle bcr/abl füzyon geni ekspresyonu olan K562 hücre serilerinde bu durumun daha belirgin olması, philadelphia kromozom anomalisi ile seyreden akut lösemilerin yüksek tedavi yanıtızsızlık oranları ile uyumlu idi. Yapılan bir çalışmada da U937 (histiositik lenfoma hücre serisi) ve HL60 hücre serilerinde ara-C ile 4 saat inkübasyon sonrası apoptozise özgü morfolojik değişiklikler gözlenirken, K562 hücre serilerinde bu değişiklikler gözlenmemiştir (123).

Ara-C'ye benzer olarak K562 hücre serisinin sitozin nükleotid analogları azasitidin ve desitabin'e karşı dirençli olması bcr/abl füzyon geni varlığının ilaç direncinde önemli rol oynadığını göstermekteydi. Buna karşılık K562 hücre serisinden farklı olarak NB4 ve HL60 hücre serilerinde azasitidin ve desitabin ile hücre canlılığı azalırken, desitabinin bu etkiyi azatidine göre daha da düşük dozlarda sağladığı gözlendi. Hollenbach PW. ve arkadaşları THP-1 (monositik lösemi hücre serisi) ve HL60 hücre serilerinde desitabin ve azasitidin aktivitelerini karşılaştırdıkları bir çalışmada her iki ilacın DNMT-1 depleksiyonuna neden olduğunu, DNA hipometilasyonu ve DNA hasar indüksiyonu yaptığını ve bu etkileri desitabinin azasitidinden 2-10 kat daha az konsantrasyonlarda gerçekleştirdiğini gözlemişler ve azasitidin 1 μ M zeri konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerinde desitabinden daha etkin olduğunu, total protein sentezinin yalnızca azasitidin ile azaldığını, azasitidin tüm hücre siklusu fazlarını azaltırken, desitabinin G2-M geçişinde artışa neden olduğunu ve bu farklı etkilerin azasitidin RNA inkorporasyonuna bağlı olabileceğini belirtmişlerdir (124).

K562, HL60 ve NB4 hücre serilerine anti-kanser etkileri üzerine çalışmaları devam etmekte olan doğal bir bileşik propolisin etken maddelerinden olan CAPE ilave edildiğinde, HL60 ve NB4 hücre serilerinde (5 μ M) K562 hücre serisine (7-8 μ M) göre daha düşük konsantrasyonda olmak üzere her üç hücre serisinin canlılık oranlarında azalma saptandı. Ara-C, desitabin ve azasitidin yanıtızsız K562 hücre serilerinde daha yüksek dozlarda da olsa CAPE ile canlılığın azalması bize CAPE'in dirençli hücre serilerinde de farklı mekanizmalarla etkili olabileceğini

göstermekteydi. Yapılan çalışmalarda farklı hücre serilerinde CAPE'in IC50 dozunun C6 gliom hücrelerinde 50 µM, MCF-7 meme kanseri ve MDA-MB-435 melanom hücre serisinde 5,95 µM, J774 makrofaj hücre serisinde 1,5 µM, CCRF-CEM insan T-hücreli ALL hücre serisinde 1 µM olarak bulunması, CAPE'in birden çok yolağı etkileyebildiğini desteklemekteydi (125-128).

Çalışmamızda ara-C, desitabin ve azasitidin dirençli K562, ara-C dirençli HL60 ve NB4 hücre serilerinde ara-C, desitabin ve azasitidin ile CAPE birlikte kullanımında K562 hücre serisinde azasitidin hariç diğer tüm hücre serilerinde ilaçlara karşı mevcut olan direncin düzeldiği gözlemlendi. Literatüre bakıldığında öncesinde CAPE ile ara-C, desitabin ve azasitidin birlikte kullanıldığı çalışma bulunmamaktadır. Ara-C, desitabin ve azasitidin dirençli hücre serilerinde CAPE ile etkinliğin artması bize, farklı etki mekanizmalarının sinerjik etkisi veya mevcut etki mekanizmasındaki direncin ortadan kaldırılması ile ilişkili olduğunu göstermekteydi. Chen YJ. ve arkadaşlarının HL-60 hücre serilerinde CAPE ile indüklenmiş apoptozis mekanizmasını açıklamak amacıyla yaptıkları çalışmada CAPE'in lösemi hücresine hızla girdiğini, konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak büyümelerini inhibe ettiğini göstermişler ve aynı zamanda CAPE'in karakteristik DNA fragmantasyonunu ve bu hücrelerde apoptozisin tipik morfolojik değişikliklerini indüklediğini tanımlamışlardır. Sonuç olarak CAPE'in potent bir apoptozis indükleyici bir ajan olduğu; aktivitesini bcl-2 down-regülasyonu, bax up-regülasyonu ve kaspaz-3 aktivasyonuna neden olarak gösterdiği belirtilmiştir (8). CAPE'in anti-oksidan etkileri ile apoptozis arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada da CAPE'in glutasyonu azaltarak büyümeyi inhibe ettiği ve bu inhibisyonun N-asetil sistein muamelesi ile azaldığı gösterilmiştir (9). Medüllablastom hücre serilerinde yapılan bir başka çalışmada da CAPE'in daha önce bahsedilen etkilerine ek olarak genotoksik ajanlara karşı hücre savunmada önemli bir rol oynayan NF-κB (nükleer faktör kappa B) inhibisyonu ile de sitotoksik etkilerini gösterdiği belirtilmiştir (106). Mekanizması tam açıklanamamış olsa da CAPE'in kemoterapi ve radyoterapiye karşı hassasiyeti artırarak tedavi etkinliğini artırdığı da bildirilmiş olup, yapılan bir başka çalışmada lösemi hücreleri tarafından da eksprese edilen ABC taşıyıcılar gen ailesine ait Multiple Drug Resistance (MDR1) ekspresyonunun, MDA-231 meme kanseri hücre hattında CAPE tarafından baskılanabildiği

gözlenmiştir (105-108). Aynı zamanda yapılan çalışmalarda myeloblastik lösemi hücrelerinin glutatyon sentetaz enzim aktivitesinde artış sonucunda apoptozisten korunduğu, kemoterapötik ajanlar tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı direnç kazandığı belirtilmiştir (3, 129). Desitabinin HL-60 ve U937 histiositik lenfoma hücre serilerinde apoptotik ve antiproliferatif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada antiproliferatif etkilerinin intrasellüler reaktif oksijen ürünleri üretimine bağlı olduğu ve bu etkinin N-asetil sistein ile engelenemediği gösterilmiştir (130). Tüm bu çalışmalar CAPE'in apoptotik, anti-oksidan ve MDR gen üzerinden sinerjik etki ile ilaç direncinde etkin olabileceğini göstermekte olup, çalışmamızdan elde edilen sonuçlar CAPE'in ilaç direncini ortadan kaldırmada bu yolları kullandığını telkin etmekteydi.

K562 hücre serisinde CAPE ile desitabin direnci düzeldiğinde, azasitidin direncinin düzelmemesi bize sitozin nükleozid analoglarının birbirleri ile aynı olmayan etki mekanizmasına sahip olduklarını, antineoplastik aktivitelerinin hücresel temelini muhtemelen DNA hipometilasyonu ile sınırlı olmadığını göstermekteydi. Yapılan çalışmalarda da desitabin ile ara-C'nin benzer yapılara ve metabolik yollara sahip olduğu, hücre içinde her ikisinin de hız sınırlayıcı enzim deoksisisitidin kinaz tarafından monofosfat forma fosforile edildiği ve sonra da diğer hücresel kinazlar tarafından difosfat ve trifosfat formlarına dönüştürüldüğü gözlenmiştir (131). Azasitidine karşı gelişen direnç mekanizmalarını açıklamak için yapılan bir çalışmada ise direncin G2-M kontrol noktasının yeniden oluşturulmasından ve aktivasyon yolağında hız kısıtlayıcı enzim olan UCK-2 (üridin sitidin kinaz 2)'deki nokta mutasyonunun varlığından kaynaklandığı belirtilmiştir (132). Desitabin ve ara-C'nin aynı metabolik yollar üzerinden aktif metabolitlerine dönüşmesi ve ilaçlara karşı direncin bcr/abl füzyon geni ekspresyonuna bağlı olarak tirozin kinaz aktivitesinin artmış olduğu K562 hücre serisinde daha belirgin olması, CAPE'in bu ilaçlara karşı gelişen direnci kinaz inhibisyonu ve membran transportuna etkiyle düzeldiğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, CAPE'in K562, HL-60 ve NB-4 hücre serilerinde hücre çoğalmasını engellediği, ilaç direncini düzelttiği, kemoterapi ilaçlarıyla birlikte kullanımının etkinliği arttırabileceği ve elde edilen sonuçların ileri araştırmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatine varıldı.

6. SONUÇ

Propolisin etken maddesi olan CAPE'in HL60, K562 ve NB4 lösemi hücre serilerindeki ilaç direnci üzerine etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada;

- Hücre canlılık oranı ara-C ile K562 ve NB4 hücre serilerinde 100 nM konsantrasyonda sırasıyla %76.40 ve %81.6, HL60 hücre serisinde 50 nM konsantrasyonda %57.39 olarak saptanmış olup, K562 hücre serisinde daha belirgin olmak üzere üç hücre serisi de ara-C'ye karşı dirençli idi.
- Azasitidin ile 1 µM konsantrasyonda HL60 ve NB4 hücre serilerinde hücre canlılık oranı sırasıyla %49.29 ve %29.2, aynı konsantrasyonda K562 hücre serisinde canlılık oranı ise %77.01 olarak tespit edildi. Azasitidin HL60 ve NB4 hücre serilerinde etkin iken, K562 hücre serisi azasitidin dirençli bulundu.
- Desitabin ile 0.5 µM konsantrasyonda HL60 ve NB4 hücre serilerinde hücre canlılık oranı sırasıyla %24.26 ve %12.71, aynı konsantrasyonda K562 hücre serisinde canlılık oranı %72.30 olarak tespit edilmiş olup, azasitidine benzer olarak K562 hücre serisinin desitabine dirençli olduğu gözlemlendi.
- K562, HL60 ve NB4 hücre serileri CAPE ile muamele edildiğinde 5 µM konsantrasyonda hücre canlılığı K562 hücre serisinde %65.41, HL60 hücre serisinde %37.54 ve NB4 hücre serisinde %32.51 olarak tespit edildi.
- Her üç ilaca da dirençli olduğu saptanan K562 hücre serisinde, hücre canlılık oranlarının desitabin ve CAPE birlikte kullanımında %60.65'ten %23.99'a gerilediği ve bu bulgunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0.05$). Ancak azasitidin ile benzer bulgu izlenmedi.
- Ara-C'ye karşı dirençli bulunan K562, HL60 ve NB4 hücre serilerine ara-C ve CAPE birlikte uygulandığında, K562 hücre serisinde hücre canlılığı %66.30'dan %16.88'e, HL60 hücre serisinde %83.24'ten %10.05'e ve NB4 hücre serisinde ise ara-C ile canlılık oranında azalma saptanmaz iken, birlikte kullanım ile canlılık oranının %42.72'ye gerilediği gözlemlendi ve bulgular istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.001$) ($p<0.05$).

7. KAYNAKLAR

1. Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia. *Experimental Hematology*. 2009; 37 (6): 649-58.
2. Vignetti M, et al. Probability of long term disease free survival of acute myeloid leukemia patients after first relapse . *Annals of Oncol*. 1996;7 (9): 933-8.
3. WoodP, et al. P glicoprotein expression on acut myeloid leukemia blast cells at diagnosis predicts response to chemotherapy and survival . *B J Haematol*. 1994; 87 (3): 509-14
4. Borelli F, Izzo AA, et al. Effect of a propolis extract and cafeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia*. 2002; 73 (1):38-43
5. Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of cafeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem*. 2002; 50 (3): 468-72.
6. Bhimani RS, Troll W, Grunberger D, Frenkel K. Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Res*. 1993; 53 (19): 4528-33
7. Lee SK, Song L, Mata-Greenwood E, et al. Modulation of in vitro biomarkers of the carcinogenic process by chemopreventive agents. *Anticancer Res*. 1999; 19 (1A): 35-44
8. Chen YJ, Shiao MS, Hsu ML, et al . Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *J. Agri. Food Chem*. 2001; 49 (11): 5615-9
9. 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): 143-9
10. Yamamoto JF, Goodman MT. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics. *Cancer Causes Control*. 2008; 19 (4): 379-90
11. Aquino VM. Acute myelogenous leukemia. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2002; 32 (2):50-8.
12. Forman D, Stockton D, Moller H, et al. Cancer prevalence in the UK: results from the EUROPREVAL study. *Ann Oncol* 2003; 14 (4): 648-54.

13. Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 2006; 107 (9): 2099-107.
14. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Fay MP, Feuer EJ, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2000*. National Cancer Institute; Bethesda MD: 2003.
15. Schwartz CL, Cohen HJ. Preleukemic syndromes and other syndromes predisposing to leukemia. *Pediatr Clin North Am* 1988; 35 (4): 853-71.
16. Taylor GM, Birch JM. The hereditary basis of human leukemia, In Henderson ES, Lister TA, Greaves MF (eds): *Leukemia*, (ed6). Philadelphia, PA, Saunders. 1996: 210-45.
17. Fong CT, Brodeur GM. Down's syndrome and leukemia: Epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet.* 1987; 28 (1):55-76.
18. Sandler DP, Ross JA. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin Oncol.* 1997; 24 (1): 3-16.
19. Linet MS, Devesa SS. Epidemiology of leukemia: overview and patterns of occurrence, In Henderson ES, Lister TA, Greaves MF (eds). *Leukemia*, Philadelphia, WB, Saunders. 2002: 131-51.
20. Estey E, Thall P, Beran M, 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): 2969-77.
21. Mufti GJ, Flandrin, G, Schaefer HE, et al. *An atlas of malignant haematology, cytology, histology and cytogenetics*. Philadelphia, Lippincott-Raven. 1996.
22. 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.
23. Brunning RD, Vardiman J, Matutes E. Acute myeloid leukemia. In Jaffe E, Haris N, Stein H, Vardiman J (eds). 2001: 75-107. *World Health Organization classification of tumours pathology and genetics tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, France: IARC Pres.
24. Vardiman JW, Haris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100 (7): 2292–302.

25. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114 (5): 937-51.
26. 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): 788-93.
27. Baer MR, Barcos M, Farrell H, et al. Acute myelogenous leukemia with leukemia cutis: Eighteen cases seen between 1969 and 1986. *Cancer*. 1989; 63 (11): 2192-200.
28. 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): 577-80.
29. Cassileth PA, Sylvester LS, Bennett JM, Begg CB. High peripheral blast count in adult acute myelogenous leukemia is a primary risk factor for CNS leukemia. *J Clin Oncol* 1988; 6 (3): 495-8.
30. Peterson BA, Brunning RD, Bloomfield CD, et al. Central nervous system involvement in acute nonlymphocytic leukemia: A prospective study of adults in remission. *Am J Med*. 1987; 83 (3): 464-70.
31. Cohen PR, Talpaz M, Kurzrock R. Malignancy-associated Sweet's syndrome: review of the world literature. *J Clin Oncol*. 1988; 6 (12): 1887-97.
32. Wiernik PH. Extramedullary manifestations of adult leukemia. In *American Cancer Society atlas of clinical oncology adult leukemias*. London, BC Decker. 2001; 275-92.
33. Yanada M, Matsushita T, Suzuki M, et al. Disseminated intravascular coagulation in acute leukemia: clinical and laboratory features at presentation. *Eur J Haematol*. 2006; 77 (4): 282-7.
34. Nagendra S, Meyerson H, Skallerud G, Rosenthal N. Leukemias resembling acute promyelocytic leukemia, microgranular variant. *Am J Clin Pathol*. 2002; 117 (4): 651-7.
35. Lichtman MA, Rowe JM. Hyperleukocytic leukemias: rheological, clinical and therapeutic considerations. *Blood*. 1982; 60 (2): 279-83.
36. Baer MR. Management of unusual presentations of acute leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1993; 7(1): 275-92.

37. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, 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): 453-74.
38. Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001; 14(3): 497-529.
39. Mroćzek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004; 18(2): 115-36.
40. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, 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): 354-65.
41. Nucifora G, Rowley JD. AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1995; 86 (1): 1-14.
42. Nucifora G, Birn DJ, Erickson P, 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): 883-8.
43. Chang VT, Aviv H, et al. Acute myelogenous leukemia associated with extreme symptomatic thrombocytosis and chromosome 3q translocation: case report and review of literature. *Am J Hematol*. 2003; 72 (1): 20-6.
44. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (Eds), IARC Press, Lyon 2008; 49.
45. Berger R, Bernheim A, Sigaux F, et al. Acute monocytic leukemia chromosome studies. *Leuk Res*. 1982; 6 (1):17-26.
46. 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.
47. Godley LA, LeBeau MM. Cytogenetics and molecular abnormalities. In: Williams Hematology, 8th ed, Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, et al. (eds), McGraw-Hill, Burr Ridge, IL 2010.
48. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol* 2008; 26 (29): 4791-7.

49. Soenen V, Preudhomme C, Roumier C, 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): 1008-15.
50. Olopade OI, Thangavelu M, Larson RA, et al. Clinical, morphologic, and cytogenetic characteristics of 26 patients with acute erythroblastic leukemia. *Blood*. 1992; 80 (11): 2873-82.
51. O'Regan S, Carson S, Chesney RW, Drummond KN. Electrolyte and acid-base disturbances in the management of leukemia. *Blood*. 1977; 49 (3): 345-53.
52. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9(10): 1783-6.
53. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997; 90 (8): 2863-92.
54. Robertson MJ, Ritz J. Prognostic significance of the surface antigens expressed by leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 1994; 13 (suppl 1): 15-22.
55. Paietta E, Andersen J, et al. The immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL): an ECOG study. *Leukemia*. 1994; 8 (7): 1108-12.
56. Sekeres MA, Peterson B, Dodge RK, et al. Differences in prognostic factors and outcomes in African Americans and whites with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004; 103 (11): 4036-42.
57. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2009; 361 (13): 1249-53.
58. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006; 368 (9550): 1894-907.
59. Dillman RO, Davis RB, Green MR, 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 (10): 2520-6.
60. Rowe JM, Kim HT, Cassileth PA, 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): 5012-21.
61. Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, 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): 1649-56.

62. Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 1995; 332 (4):217-23.
63. Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RM, 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): 700-8.
64. 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.
65. Löwenberg B, Zittoun R, Kerkhofs H, 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; 7 (9): 1268-74.
66. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2009; 113 (9): 1875-91.
67. Stanisic S, Kalaycio M. Treatment of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2002; 2 (3): 287-295.
68. 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): 130-40.
69. Estey E, Kornblau S, Pierce S, Kantarjian H, Beran M, Keating M. A stratification system for evaluating and selecting therapies in patients with relapsed or primary refractory acute myelogenous leukemia. *Blood.* 1996; 88 (2): 756-60.
70. Herzig RH, Lazarus HM, Wolff SN, et al. High dose cytosine arabinoside therapy with and without anthracycline antibiotics for remission reinduction of acute nonlymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 1985; 3(7): 992-97.
71. Carella AM, 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.
72. Jackson GH, 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: 127-37.

73. Ratip S, et al . Effectiveness of FLAG chemotherapy in refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Turk J Haematol.* 2001; 18: 53-8.
74. Webb DK. Treatment of relapsed AML in children. *B J Haematol.* 1999; 104 (2): 420-1.
75. De la Rubia J, et al. FLAG-IDA regimen in treatment of patients with high risk myeloid malignancies. *Leukemia Res.* 2002; 26 (8): 725-30.
76. Fleishhack G, et al. 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 (3): 647-55.
77. Hanel M, et al. MITO-FLAG as salvage therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Onkologie.* 2001; 24 (4): 356-60.
78. Thomas X, 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): 957-63.
79. Liu Yin JA, et al. Comparison of sequential versus standart 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 (3): 713-26.
80. Karanes C, et al. A phase III comparison high dose ara-C (HIDAC) versus HIDAC plus mitoxantrone in the treatment of first relapsed or refractory acute myeloid leukemia Southwest Oncology Group study. *Leukemia Research.* 1999; 23 (9): 787-94.
81. Webb DK. Manegement of relapsed acute myeloid leukemia. *B J Haem.* 1999; 106 (4): 851-9.
82. Gorin NC, et al. New developments in the therapy of acute myelocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2000; 69-89.
83. Estey EH. New drugs for therapy of AML. *Leukemia.* 2002; 16 (3): 306-9.
84. Baer MR, et al. Phase III study of PSC-833 modulation of MDR in previously untreated acute myeloid leukemia patients >60 years. (CALGB 9720). *Blood.* 1999; 94 (suppl. 1): 383a (abstr).
85. Visani G, et al. Combined action of Valdospar, a novel MDR reversing agent, with mitoxantrone, etoposide and cytarabine in poor prognosis acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2001; 15:764-71.

86. List AF, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor risk acute myeloid leukemia: a SWOG study. *Blood*. 2001; 98 (12): 3212-20.
87. Bassan R. et al. Phase I trial with escalating doses of idarubicin and multidrug resistance reversal by short course CsA, sequential acute leukemia. *Haematologica*. 2002; 87 (3): 257-63.
88. Paulino N, Teixeira C, et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. *PlantaMed*. 2006; 72 (10): 899-906.
89. Tekeli A. Etlik civciv rasyonlarında doğal büyüme uyarıcı olarak bitkisel ekstraktların ve propolisin kullanım olanakları, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2007.
90. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *PlantaMed*. 1994; 60(3): 222-7.
91. 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; 201953.
92. Nolkemper S, Reichling J, Sensch KH, Schnitzler P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine*. 2010; 17 (2): 132-8.
93. Watanabe MA, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol*. 2011; 63(11): 1378-86.
94. Çam H. Sıçanlarda aspirin ile uyarılan gastritin önlenmesinde kafeik asit fenetil ester'in etkinliğinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta, 2007.
95. Sawicka D, Car H, et al. The anticancer activity of propolis. *Folia Histochem Cytobiol*. 2012; 50 (1): 25-37.
96. Sulaiman GM, Ad'hiah AH, et al. Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50(5): 1632-41.
97. Hehlhans 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): 243-53.
98. 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): 11065-70.

99. Vatansever HS, Sorkun K, et al. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem.* 2010; 112 (6): 546-56.
100. Avci CB, Gündüz C, 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): 41-7.
101. Grunberger D, Banerjee R, et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia.* 1988; 44 (3): 230-2.
102. Chen MJ, Chang WH, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatology.* 2008; 8 (6):566-76.
103. JiN UH, Song KH, Motomura M, Suzuki I, Gu YH, Kang YJ, Moon TC, Kim CH. Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Mol Cell Biochem.* 2008; 310 (1-2): 43-8.
104. Xiang D, Wang D, He Y, Xie J, Zhong Z, Li Z, Xie J. 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): 753-62.
105. 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 (5B):1841-8.
106. Lee YY, Kao CL, Tsai PH, Tsai TH, Chiou SH, Wu WF, Ku HH, Wong TT. Caffeic acid phenethyl ester preferentially enhanced radiosensitizing and increased oxidative stress in medulloblastoma cell line. *Childs Nerv Syst.* 2008; 24 (9):987-94.
107. Cavaliere V, Papademetrio DL 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.
108. 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): 1279-88.
109. Collins SJ. The HL-60 Promyelocytic Leukemia Cell Line: Proliferation, Differentiation and Cellular Oncogene Expression. *Blood.* 1987; 70 (5): 1233-44.

110. Collins S, Groudine M: Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukemia cell line. *Nature*. 1982; 298 (5875): 679-81.
111. Lanotte M, Martn-Thouvenin V, et al. NB4, a maturation inducible cell line with t(15:17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood*. 1991; 77 (5): 1080-6.
112. Gallagher R, Collins S, et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1979; 54 (3): 713-33.
113. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myolegenous leukemia cell line with positive philadelphia chromosome. *Blood*. 1975; 45(3): 321-34.
114. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, et al. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 1976; 18 (4): 421-31.
115. Anderson LC, Jokinen M, Gahmberg CG. Induction of erythroid differentiation in the human leukemia cell line K562. *Naature*. 1979; 278: 364-65.
116. Goldie JH, Coldman AJ. Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors. *Cancer Treatment Reports*. 1983; 67 (10): 923-31.
117. Mesa RA, Tibes R. MPN blast phase: Clinical challenge and assessing response. *Leuk Res*. 2012; 36 (12): 1496–7.
118. Johnson SA. Nucleoside analogues in the treatment of haematological malignancies. *Expert Opin Pharmacother* 2001; 2 (6): 929-43.
119. Negoro E, Yamauchi T, Urasaki Y, Nishi R et al. Characterization of cytarabine-resistant leukemic cell lines established from five different blood cell lineages using gene expression and proteomic analyses. *Int J Oncol*. 2011; 38 (4): 911-9.
120. Lubbert M, Minden M. Decitabine in acute myeloid leukemia. *Semin Hematol*. 2005; 42 (3 suppl 2): S38-42.
121. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002; 3 (6): 415-28.
122. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5 (1): 37-50.
123. Akiyama H, Suzuki K, Ino T, et al. Evaluation of cytarabine-induced apoptosis in leukemic cell lines; utility of annexin V method. *Rinsho Byori*. 1999; 47 (8):774-9.

124. Hollenbach PW, Nguyen AN, Brady H, et al. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One*. 2010; 5 (2): e9001.
125. Lee JY, Kuo CH, Chu CY, 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 (12): 2281-9.
126. Brudzynski K, Carlone R. Stage-dependent modulation of limb regeneration by caffeic acid phenethyl ester (CAPE)-immunocytochemical evidence of a CAPE-evoked delay in mesenchyme formation and limb regeneration. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 2004; 301 (5): 389-400.
127. Rossi A, Ligresti A, Longo R, et al. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine*. 2002; 9 (6): 530-5.
128. Biray Ç, Gündüz C, Yılmaz B ve ark. Propolis ve etken maddeleri olan kafeik asit fenetil ester ve sinamik asitin, insan T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi (CCRF-CEM)'de sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi*. 2006; 45 (2): 83-92.
129. Siitonen T, Alaruikka P, et al. Protection of acute myeloblastic leukemia cells against apoptotic cell death by high glutathione and gamma-glutamylcysteine synthetase levels during etoposide-induced oxidative stress. *Ann Oncol*. 1999; 10 (11): 1361-7.
130. Shin DY, Park YS, Yang K, et al. Decitabine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces apoptosis in human leukemia cells through intracellular reactive oxygen species generation. *Int J Oncol*. 2012; 41 (3): 910-8.
131. Qin T, Youssef EM, et al. Effect of Cytarabine and Decitabine in Combination in Human Leukemic Cell Lines. *Clin Cancer Res*. 2007; 13 (14): 4225-32.
132. Sripayap P, Nagai T, Uesawa M, et al. Mechanisms of resistance to azacitidine in human leukemia cell lines. *Exp Hematol*. 2014; 42 (4): 294-306.