

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

**DEKSAMETAZON, ATRA ve VİTAMİN D3'ÜN AML HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Feyyaz ÖZDEMİR

Trabzon 1999

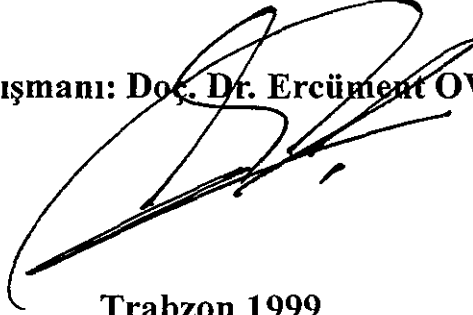
T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DEKSAMETAZON, ATRA ve VİTAMİN D3'ÜN AML HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Feyyaz ÖZDEMİR

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ercüment OVALI



Trabzon 1999

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER.....	I
KISALTMALAR.....	II
1-GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2-GENEL BİLGİLER.....	2
3-MATERYAL ve METOD.....	23
4-BULGULAR.....	31
5-TARTIŞMA.....	53
6-SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	59
7-ÖZET.....	60
8-İNGİLİZCE ÖZET.....	61
9-KAYNAKLAR.....	62

KISALTMALAR

ALL	: Akut lenfositik lösemi
AML	: Akut myelositik lösemi
ANLL	: Akut nonlenfositik lösemi
APL	: Akut promyelositik lösemi
ARA-C	: Cytosine-Arabinozide
ATRA	: All trans retinoik asit
DIC	: Dissemine intravasküler koagülopati
FAB	: Fransız - Amerikan - İngiliz
G-CSF	: Granülosit koloni sitimüle edici faktör
GIS	: Gastrointestinal sistem
GK	: Glikokortikoid
GM-CSF	: Granülosit – makrofaj koloni sitimüle edici faktör
HGF	: Hematopoetik büyüme faktörü
IL	: İnterlökin
KİT	: Kemik iliği transplantasyonu
M - CSF	: Makrofaj koloni sitimüle edici faktör
MPO	: Myeloperosidase
RA	: Retinoik asit
RAR	: Retinoik asit reseptörü
PML	: Promyelositik lösemi
SSS	: Santral sinir sistemi
Tdt	: Terminal deoxyribonucleotidyl transferase
TNF	: Tümör nekrozis faktör

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut lösemiler, hematopoetik progenitör hücrelerin neoplastik transformasyonu ve klonal proliferasyonu sonucu kemik iliğinde immatür hücrelerin artışıyla oluşan hastalıklardır. Akut lösemiler akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve akut myeloblastik lösemi (AML) olarak iki ana gruba ayrılır (1).

AML tedavisinde son on yıldır klasik antiproliferatif ve litik tedavinin yanında diferansiyasyon tedavileri tartışılmaya başlanmış ve hatta ATRA ile AML-M3'de uygulamaya girmiştir (2). Diferansiyasyon tedavisinde sıkça ismi geçen diğer iki ajan da glukokortikoidler (GK) ve vitamin D3 analoglarıdır.

GK'ler birçok lenfoid malignenside apoptozisi indüklemesi, hücre siklusunu yavaşlatması nedeniyle sıkça kullanılmakta olup özellikle AML'de bu etkilerine ilaveten hücre olgunlaşmasını indükleyerek tümör kontrolünü sağlayabileceği iddia edilmektedir. Benzer olarak vitamin D3 analoglarının da AML'de antiproliferatif ve diferansiyasyonu indükleyici etkilerinden söz edilmeye başlanmıştır (3-6).

Bu ajanlar hakkındaki verilerin çoğu cell-line'lar üzerinde elde edilen sonuçlar olup insan çalışmaları kısıtlıdır. Bu nedenle söz konusu ajanların AML hücrelerindeki etkilerinin hasta hücreleri üzerinde araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AML

2.1.1. Tanım

Akut myeloid lösemi (AML) veya akut nonlenfositik lösemi belirli hematopoetik hücre serilerinin terminal diferansiasyonundaki blok ile karakterize hematolojik hastalıkların heterojen bir grubu olarak tanımlanır (7). Normal hematopoetik kök hücreler gibi lösemi hücreleri, bölünme ve proliferasyon kapasitelerini kendilerinde barındırırlar. Farklılaşma kapasiteleri morfolojik ve fonksiyonel olarak matür hematopoetik hücrelere göre belirgin olarak bloke olmuştur (7).

AML olarak adlandırılan lösemiler arasında eritroid, monositik ve megakaryositik lösemiler de yer aldığı için AML yerine akut nonlenfositik lösemi (ANLL) denilmesi daha doğrudur. Ancak AML terimi daha sıklıkla kullanılır (8). ANLL'nin patogenezi kesin olarak aydınlatılamamıştır, fakat kromozom anomalileri, hastaların %50-%70'inde bulunmuştur. Hastaların bir kısmında bazı genetik sendromlar ve toksik etkileşimler patogeneze katkıda bulunabilmektedir. Onkogenlerin rolü tam anlaşılmış değildir. İlk çalışmalar bazı protoonkogenlerin ekspresyonunun ANLL nin alt tipleri ve prognozları ile bağlantılı olabileceğini göstermiştir. ANLL deki orijin hücre çok sıklıkla myeloid veya monositik farklılaşma gösteren bir blast hücrelidir (9).

Normal kemik iliği fonksiyonunun inhibisyonu ile karakterize bu hastalık şiddetli kanama, enfeksiyonlar ve metabolik komplikasyonlara sebep olabilmekte ve tedavisiz bırakıldığı takdirde her zaman letal özellik gösterebilmektedir (7).

2.1.2. Epidemiyoloji

Bütün yıllık insidans yaş ile artan sıklıkla beraber ortalama olarak 100.000 de 2-3 tür . 75 yaşındakiler için insidans 1.000.000 da 14 olmasına karşılık 30 yaşının altındaki her yaş için insidans 100.000 de 1 den azdır. Erkekler kadınlardan daha yüksek bir insidansa sahiptir . AML 10 yaşın altındaki çocuklardaki lösemi vakalarının %12 sinden ve 10-15 yaşları arasındakilerin %28 inden sorumludur . Yetişkinlerde AML akut lösemi vakalarının %80-90 ını oluşturur . Şaşırtıcı bir şekilde konjenital lösemi olgularında AML, ALL den daha sık görülür. İnsidans oranları gelişmiş ülkelerde ve sanayileşmiş şehirlerde daha yüksektir. Yapılan çalışmalar Batı Avrupa Yahudileri için artmış bir riski ve doğu halkları için azalmış bir riski göstermektedir (9).

2.1.3. Etiyoloji

Epidemiyolojik çalışmaların da desteği ile genetik, çevresel ve mesleki faktörlerin AML nin patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir . Bugünkü deliller lökomogenezin çeşitli evrelerde indükleyici ajanların etkisiyle hematopoetik bir progenitör hücrenin etkilenmesi sonucu ortaya çıkan çok aşamalı bir süreç olduğunu telkin etmektedir. Bütün lösemili hastalarda lösemiye sebep olduğu gösterilmiş tek bir faktör yoktur (7).

Kromozomal anomaliler ile karakterize sendromlar AML nin gelişimindeki genetik faktörlere örnek gösterilebilir. Down sendromlu veya trizomi 21'li çocuklar AML veya ALL nin her ikisi için artmış risk taşımaktadırlar. Fankoni anemisi, Bloom's sendromu, ataksi telenjiektazi, Klinefelter sendromu ve nörofibromatozisi içeren diğer konjenital sendromlar AML için artmış bir risk taşımaktadırlar . Kronik myeloproliferatif hastalıklar, aplastik anemi, paroksizmal noktürnal hemoglobinüri ve myelodisplastik sendromu içeren kazanılmış hastalıklar AML gelişimi riskini artırmaktadırlar (9). İkiz çalışmaları, monozigotik ikizlerde lösemnin riskinde artış olduğunu desteklemektedir .

Çevresel faktörler de, AML nin patogenezinde tartışılmıştır. İyonize edici radyasyona ve kimyasal maddelerin bir kısmına maruziyet, akut lösemnin gelişmesiyle ilişkilendirilmiştir. Radyasyona maruziyet ile lösemi gelişimi arasındaki ilişki hakkındaki

bilgiler kısmen Hiroşima ve Nagazaki'deki atom bombası patlamalarının uzun dönem takibinden elde edilmiştir .Lösemi gelişimi için etkilenim sonrası latent süre 5-21 yıldır ve risk radyasyon dozuna ve etkilenme sırasındaki yaşa bağlıdır .Hiroşima'da AML ve KML nin her ikisinin insidansında 30 katlık bir artış vardı ve en yüksek oranlar 10 yaşın altındaki ve 50 yaşın üzerindeki insanlarda görülmekteydi. Nagazaki'deki AML insidansı daha büyüktü .M3 hariç (akut promyelositik lösemi) AML nin tüm subtipleri gözlenmişti (7) .

Kimyasal maddelerin bir kısmına kronik maruziyetler akut lösemiye sebep olabilmektedir. Benzen, en iyi bilinen, üzerinde çalışılmış ve kimyasal lokomojenik ajan olarak deneysel amaçlı çok geniş çapta kullanılmış olan bir maddedir. Benzen ve benzen derivelerine kronik olarak maruz kalan deri ve kauçuk endüstrisi işçilerinde AML'ye daha sıklıkla rastlanmaktadır (7).

Ayrıca sigara içenler ve sigara dumanına kronik olarak maruz kalmış kişilerde AML gelişimi riskinde artma olduğu görülmüştür (10).

Bazı kazanılmış hastalıklar AML'ye transforme olabilmektedir. Polisitemi vera, primer trombositemi ve agnojenik myeloid metaplaziyi içeren belirli myeloproliferatif hastalıklar bu duruma hassastırlar . Polisitemi vera da AML insidansı sadece periyodik flebotomilerle tedavi edilmiş hastalarda yaklaşık olarak %1 dir. Kemoterapi ve radyoterapinin ilavesi bu insidansı belirgin bir şekilde artırabilmektedir (7).

RNA tümör virüsleri (retrovirüsler), fareler, kediler ve gibbon maymunlarını içeren farklı hayvan modellerinin bir kısmında lökomojeniktir ve lokomojenezis çalışmaları için önemli laboratuvar modellerini teşkil ederler. Ancak yoğun çalışmalara rağmen insan AML sinde retrovirusların oynadığı rol net bir şekilde açıklığa kavuşturulamamıştır (7) .

2.1.4. Patogenez

Akut lösemi tek bir hücreden başlar ve bu hücrenin klonal proliferasyonu ile gelişir. AML, myeloid öncü hücrelerinin neoplastik transformasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu transformasyonun hangi basamakta olduğu konusu hastalara göre farklılıklar göstermektedir. Bazı olgularda lösemik transformasyon myeloid stem hücresi düzeyinde olurken bazı hastalarda yönlendirilmiş daha olgun hücrelerde meydana gelmektedir. Akut lösemilerde transformasyona uğramış lösemik hücreler maturasyon kusuru göstermektedirler. Başka bir

deyişle akut myeloid lösemide lösemik hücreler, myeloblast ve promyelosit basamağından öteye olgunlaşmamaktadır. Lösemik hücrelerin hem aşırı çoğalması ve hem de maturasyon defekti göstermesi sonucu, bu hücreler kemik iliğini doldurarak periferik kana çıkmakta ve daha sonra lenf nodlarını, karaciğeri, santral sinir sistemini ve diğer organları infiltre etmektedir (1).

Neoplastik dönüşümün mekanizması tam anlamı ile açıklığa kavuşmamıştır. Ancak dönüşümün DNA düzeyinde olduğu kesindir. Lösemik transformasyon muhtemelen değişik basamaklardan geçerek oluşmaktadır . Lösemilerde çeşitli kromozom anomalileri bulunur. İleri tetkikler yapılacak olursa lösemilerin çoğunda kromozom anomalileri tespit edilecektir. Bu kromozomların yeniden yapılanması sonucu muhtemelen değişik onkogenler stimüle edilmekte ve bunların ürünleri lösemnin başlamasında ve devamında rol oynamaktadır (1).

2.1.4.1. Protoonkogen Mutasyonları

- N-Ras Nokta Mutasyonları
- P53 Mutasyonları

2.1.4.2. Kromozomal Translokasyonlar

Spesifik kromozomların aberran kırılma ve füzyonunu kapsayan kromozomal translokasyonlar AML'de sıklıkla bildirilmektedir. AML nin değişik tiplerinin patogenezi ile bu translokasyonlar sonucu oluşan spesifik füzyon genleri arasındaki ilişki yoğun laboratuvar çalışmalarının konusunu teşkil etmektedir. AML nin değişik formları ile ilişkili farklı kromozom translokasyonları ve bu translokasyonların herbirinde rol oynayan spesifik genler aşağıda gösterilmiştir (7).

- t (15;17) (PML / RAR- α)
- t (8;21) (ETO / AML-1)
- t (6;9) dek/can
- 5q Delesyonları
- 11q 23 Kromozomal translokasyonlar
- 16. Kromozomun İnversonu

2.1.5. Hematopoetik Büyüme Faktörleri

AML hücrelerinin HGF lere cevabı, muhtemelen AML hücrelerinin yüzeyleri üzerinde sıklıkla eksprese edilen spesifik büyüme faktör reseptörleri aracılığı ile olmaktadır .M-CSF, G-CSF, GM-CSF, EPO, IL3;IL4, IL5, IL6, IL7'ye yönelik reseptörler farklı AML örneklerinin yüzeyleri üzerinde gösterilmiştir. Bazı AML hücreleri spesifik HGF ürettiğinden ve bunlarla uyumlu reseptör eksprese ettiklerinden AML hücrelerinin sürekli proliferasyonuna otokrin bir mekanizmanın katkıda bulunduğu sanılmaktadır (7).

2.1.6. Klinik Bulgular

AML nin belirti ve semptomları genellikle nonspesifiktir ve normal hematopoetik hücrelerin azalmış üretimine ve lösemik hücreler tarafından diğer organların invazyonuna bağlıdır. En sık şikayetler yorgunluk ve halsizliktir. Anemi ile ilişkili zayıflık ve solukluk görülebilir. Ateş sıktır ve hastaların %15-20 sinde spesifik özellik taşır ve terleme ile birlikte. Nötröpeniye sekonder olarak infeksiyonlar görülebilir. Peteşi ve epistaksisi içeren hemorajik belirtiler ve semptomlar hastaların yarıya yakınında bulunabilir ve trombositopeninin derecesi ile ilişkilidir.

Hastaların %50'sinden fazlasında kilo kaybı görülür fakat genellikle ciddi değildir. Kemik ağrısı hastaların %20'sinden azında görülür. Her ne kadar organomegali ve lenf adenopati AML'li hastaların yarısından çoğunda rapor edilmişse de bu belirtiler daha sıklıkla ALL ile ilişkilidir. Deri infiltrasyonu teşhiste hastaların yaklaşık %10'unda görülür ve genellikle ilerlemiş bir döküntü ile karakterizedir. Monositik karakterdeki. Dişeti infiltrasyonu da akut monositik lösemnin belirtisidir.

Santral sinir sistemi hastalığı teşhiste nadirdir. Fakat akut monositik lösemi çeşitlerinde ve hiperlökositozis ile daha sık ilişkilidir (11). Sıklıkla asemptomatiktir. Ancak baş ağrısı ve 5-7. kranial sinir felçleri görülebilir. Göz tutulumu körlükle sonuçlanabilir. AML'nin meningeal hastalığının sıklığı ALL den daha azdır fakat AML'li çocukların %10-38 inde bildirilmiştir (9).

Diğer organ sistemleri de tutulabilir. Özellikle potasyum imbalansı başta olmak üzere çeşitli elektrolit imbalansları sonucu kardiyak anormallikler izlenebilir .Pulmoner semptomlar

lökositozisli hastalarda veya nötropeni ile ilişkili enfeksiyonu olan hastalarda görülür. Gastrointestinal semptomlar arasında enfeksiyon olarak sıklıkla perirektal apse ve nekrotizan kolitis görülür. AML li hastalarda hepatik yetmezlik ender olarak görülür (9).

Lösemnin mukozal tutulumu olarak oral veya faringeal infiltrasyonlar görülebildiği gibi kemoterapinin indüklediği mukozit tablosuda gözlenebilir (7).

2.1.7. AML'nin Alt Tipleri

FAB sınıflamasında morfolojik, immünolojik ve sitokimyasal kriterlere göre AML 8 subtip olarak tanımlanmıştır. FAB gruplamasının amacı hücre tiplerine göre myeloid lösemileri kısımlara ayırmak ve lösemik hücrelerin bu sınıflandırmada maturasyon sırasındaki yerini ortaya çıkarmaktır. AML nin bazı tipleri FAB sınıflamasına göre sınıflandırılmamaktadır. Bu sınıflandırılmayan vakalar daha sıklıkla sekonder lösemili hastalardır ve tüm vakaların yaklaşık olarak %2-5'inde görülür . FAB klasifikasyonu hibrid veya morfolojik ve histokimyasal olarak tanımlanamayan bifenotipik lösemileri kapsamamaktadır. Ayrıca FAB klasifikasyonu; klinik karakteri, sitogenetik paterni, tedavi sonrası cevabı ve prognozu göz önünde bulundurmaz (7). FAB klasifikasyonu ile sınıflandırılmış AML alt tipleri ve özellikleri tablo 1'de gösterilmiş olup aşağıda başlıklar halinde sıralanmıştır.

- M 0 Subtipi (Gelişme ve Farklılaşma Göstermeyen AML)
- M 1 Subtipi (Maturasyonsuz AML)
- M 2 Subtipi (Maturasyonlu AML)
- M 3 Subtipi (Akut Promyelositik Lösemi)
- M 4 Subtipi (Akut Myelomonositik Lösemi)
- M 5 Subtipi (Monositik Lösemi)
- M6 Subtipi (Eritrolösemi)
- M7 Subtipi (Megakaryositik Lösemi)

2.1.8. Fab Sınıflaması-Tablo 1

Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflaması olarak bilinmekte olup aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (12)

<u>Subtipi</u>	<u>Kemik İliği Morfolojisi</u>	<u>Tipik İmmünofenotip</u>	<u>İlişkili Genotip</u>	<u>Yorum</u>
AML-M0 (Andiferansiye AML)	Blastlar >%30; Sitokimya negatif	CD13, 33, 34 HLA-DR (+)	Bilinmiyor	Kötü Prognozlu
AML-M1 (Minimal maturasyonlu AML)	Blastlar >%90; Sudan Black veya peroksidaz (+) Auer body genellikle mevcut	CD13, 14, 15, 33, 34 HLA-DR (+)	Genellikle İnv (3)	Trombositozis görülebilir.
AML-M2 (Maturasyonlu AML)	Blastlar >%30; Sudan Black, peroksidaz veya choloroacetate estaraz kuvvetli pozitif Auer body görülebilir	CD13, 15, 33, 34 HLA-DR (+)	t (8;21) vakaların yarısında	t (8;21) iyi prognoz göstergesidir. Gençlerde görülür Splenomegali ve ekstramedüller tutulum izlenir
AML-M3 ile(Promyelositik lösemi)	Blastlar >%30; anormal promyelositler varlığı çok sayıda auer body, kuvvetli sitokimyasal boyanma ve granülasyon	CD13, 33, 15 zayıf CD34 HLA-DR (-)	t (15;17)	Retinoik asid tedavisi ile en iyi prognozlu AML, DIC riski yüksek, gençlerde görülür
AML-M4 (Myelomonositik lösemi)	Blastlar >%30; Monositik hücreler >%20	CD13, 14, 15, 33, 34 HLA-DR (+)	inv (16) ve diğer 16 anormallikleri	İyi prognozlu ekstro medüller tutulum görülür
AML-M5A (Monositik lösemi)	Monositik hücreler >%80, α -Naphthol boyası pozitif	CD13, 14, 33, 34 HLA-DR (+)	11q23 anormallikleri	Kötü prognozlu, ekstramedüller tutulum genellikle görülür
AML-M5B (Diferansiyonlu monositik lösemi)	Monositik hücreler <%80	CD13, 14, 33, HLA-DR (+) CD34 (-)	11q23 anormallikleri	AML-M5A gibi
AML-M6 (Eritroid lösemi)	Nükleuslu hücrelerin %50'si eritroid seriden, Non eritroid hücrelerin %30'dan fazlası blast	CD13, 33, 41, 71 HLA-DR (+) Glikoforin A	del (5), del (7) genellikle görülür	Kötü prognozlu, MDS'den dönüşüm gösterir Yaşlılarda gözükür
AML-M7 sendromu (Megakaryoblastik lösemi)	Megakaryoblastlar >%30; α - Naphthol ve PAS pozitif olabilir	CD41, 61	Genellikle inv (3)	Kötü prognozlu, Downlu çocuklarda görülebilir MDS ve KML'nin blastik kırızleri ile ilişkilidir

2.1.9 AML'de Laboratuvar Bulguları

Hastaların yarısından fazlasında lökosit sayısı artmıştır. Hastaların %20'sinden azında ise 100.000 hücre/mm³ üzerindedir. Blastlar genellikle periferik yaymada görülür ve içlerinde Auer Body bulunabilir. Alösemik lösemi (periferik yaymada blast yoktur) nadirdir. Nötropeni bu hastalarda sıktır ve hiposellüler olabilecek iliğin incelenmesi blastları gösterecektir (9).

Vakaların büyük bir kısmında hastalık teşhis edildiği zaman orta veya ağır bir anemi vardır. Anemi, genel olarak normokrom normositer olmakla beraber bazı vakalarda makrositik de olabilir. Trombosit sayısı da hemen daima düşüktür. Kemik iliği olguların çoğunda hipersellüler olup blast sayısı %30 un üzerindedir. Eritropoetik doku azalmıştır. Megakaryositlerde de azalma vardır. Kromozom analizi yapılacak olursa yarısına yakın bir kısmında kromozom anomalileri saptanabilir (1). Yaygın damar içi pıhtılaşma AML de ALL den daha fazla görülür ve akut promyelosit lösemi tipinde (M3) çok daha sıktır (9).

DIC'in lösemik hücrelerdeki azurofilik granüllerden prokoagülanların serbestlenmesine bağlı olduğu düşünülmekte olup tipik olarak indüksiyon kemoterapisi esnasında görülmektedir (9).Yaygın hücre yıkımı sonucu hiperürisemi, hiperfosfatemi, hiperkalemi ve hipokalsemi görülebilir (8).

Akut monositik lösemi veya akut myelomonositik lösemiye içeren monositik komponentli AML çeşitlerinde lizozim seviyeleri yükselmiştir (9).

2.1.10. Prognoz

AML'de prognozu belirleyen bir çok faktör vardır. Bunlar tablo 2'de gösterilmiştir. Tedaviyle ilişkili olan prognostik özellikler ise tablo 3'de verilmiştir. Son yıllarda AML tedavisinde çok büyük gelişmeler sağlanmıştır. Kemoterapi ile tüm hastaların %65 inde, 50 yaşın altındakilerde ise %70 tam remisyon gerçekleşmektedir.. Remisyonda kalma süresi ortalama 1-1.5 yıldır. Yaşlılarda prognozun kötü olmasının iki nedeni vardır. Kematerapinin iyi tolere edilememesi ve AML zemininde prolösemik patogenez olasılığı nedenleri ile yaşlılarda prognoz daha kötüdür (13)

Tedaviye cevapta hastanın yaşı, sitogenetiği ve uygulanan ilk kemoterepiye cevap oranı çok önemlidir. 60 yaşın altındaki hastaların sadece %10-12'si kötü sitogenetik özellik taşımaktadır. Bu hastaların tedavisinde kullanılan otolog, allogreft KİT ile kemoterapi uygulamaları arasında survey açısından anlamlı fark yoktur. Ancak son zamanlarda yüksek doz Ara-C uygulamasının daha faydalı olduğundan söz edilmektedir (13). Kötü prognostik indekslere sahip olanlarda ise tartışmasız allojenik kemik iliği transplantasyonu (AKİT) tercih edilmelidir.

Tablo 2 : AML'de Yaşam Süresiyle İlişkili Prognostik faktörler (9, 14).

Faktör	İyi	Kötü
Klinik		
Yaş	<45	<2, >60
Lösemi gelişimi	Kendiliğinden	Önceden MDS olması
Lokositoz	<25.000/mm ³	>100.000/mm ³
SSS tutulumu	Yokluğu	Varlığı
Morfoloji		
Auer Body	Varlığı	Yokluğu
Eozinofil	Varlığı	Yokluğu
Megaloblastik Eritroidler	Yokluğu	Varlığı
FAB Tipi	M3,M4	M5, 6, 7
Yüzey/Enzim Markırları		
Myeloid	CD14- CD13-	CD14+ CD13+ CD34+
HLA-DR	Negatif	Pozitif
TdT	Yokluğu	Varlığı
Lenfoid	CD2, CD19	Bifenotipik (2 den fazla Lenfoid markırı)
Sitogenetik		
	t (15;17), t (8;21)	
	inv (16)/del (16q)	-7, del (7q); -5, del(5q) 11q23anormallikleri

Tablo 3: AML'de Tedaviyle İlişkili Prognostik Özellikler (12).

* Yaş: 60 yaş altında tedaviye cevap ve prognoz iyi olup 60 yaş üzerinde ve ileri yaşta tedaviye cevap ve prognoz kötüdür.
* Önceden hematolojik bozukluk bulunması veya sekonder AML: Bu subgruplarda komplet remisyon oranı düşüktür ve yaşam süresi kısadır.
* Sitogenetik: t (15;17), t (18;21) ve inv (16) iyi prognoz gösterir. del 5, del 7, 3q-, 11q23 kötü prognoz gösterir.

60 yaşın altındaki iyi prognostik grup hastalarında yüksek doz kemoterapi ile vakaların %40'da 7 yıllık survey sağlanabilmektedir. Bu yüzden KİT bu grup için öncelikli tedavi şekli değildir ve ikinci komplet remisyon sonrasına ertelenmektedir. AML M3 olgularında ise asıl tedaviyi ATRA oluşturmaktadır. Hastaların çok yüksek oranında komplet remisyona neden olduğu bildirilmektedir. İyi prognostik özellik taşıyan t (8;21) ve inv16 kromozomal anomalisi olan hastalar kemoterapiye oldukça iyi cevap verirler. t (8;21) bulunan hastalarda yüksek doz Ara-C uygulaması, diğer tedavilerden çok daha etkili bulunmuştur (13).

İyi veya kötü prognostik özellik taşımayan grup hastalarında kemoterapi ile KİT uygulaması arasında survey açısından anlamlı bir farklılık yoktur (13).

60 yaşın üzerindeki hastalarda tedaviye cevap iyi değildir. Yaşın ilerlemesiyle kemoterapiye cevap oranı giderek düşmektedir. Survey üzerinde kemoterapi, KİT'den daha faydalıdır. Kemoterapi ile hastaların ortalama %65'i remisyona girmekte ancak remisyon sonrası çok kısa olmaktadır. İyi sitogenetik özellik taşıyan grupta yüksek doz kemoterapiye cevap oranı daha iyidir. Bu yaş grubundaki hastalar ortalama 1 veya 2 standart kemoterapiyi tolere edebilirler. Genellikle yüksek doz Ara-C tedavisini tolere edemezler (16).

2.1.11. Tedavi

AML de tedavi, AML'yi ALL den ayırdıktan sonra mümkün olabilir. AML tedavisi 2 temel seçeneği içerir. Bunlar:

- Yalnız başına sitotoksik kemoterapi
- Tüm vucut ışınlanması ve/veya kemoterapi den sonra kemik iliği transplantasyonunun uygulanmasıdır (9).

Genellikle antrasiklinle birleştirilen cytozine arabinozide verilmesi 20 yıldan fazla süredir AML tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Çalışmalarda cytozine arabinozi'de nin uygulanmasındaki dozlar, programlar ve metodlar farklıdır ve sonuçta majör rolü oynadığı görülmektedir (14,15).

İlk remisyonunda antrasiklinli yüksek doz cytozine arabinozidle konsolidasyon tedavisi kemoterapi sonuçlarını iyileştirmiştir. Ancak ilk remisyonunda seçilmiş hastalarda KİT, yalnız başına kemoterapiden üstün bulunmuştur (16).

Tedavide başarı, genellikle aplazi dönemi gerektiren (bazı APL'li vakalar hariç) tam remisyonudur ve hastaların %60-70 inde elde edilebilmektedir. Daha iyi cevap oranları (%70-85) genellikle 60 yaşın altındaki ve myelodisplastik sendromu olmayan hastalardır . Nadiren tedavisiz kısa spontan remisyonlar hastalığın seyrinde görülebilmektedir (9).

İndüksiyon tedavisinden sonra periferdeki blast hücreleri kaybolmuş ve kemik iliğinde %5 in altına düşmüşse, periferik kan sayımları normale gelmişse ve ekstramedüller lösemiye ait bir belirti yoksa tam remisyon bahsedilir (1).

2.1.11.1. Sitotoksik Kemoterapi

Tedavi 2 faza bölünebilir.

- **Remisyon indüksiyonu:** Genellikle Ara-C majör ilaç olup daunorubicin, idarubicin, mitoksantron ile kombine kullanılır.
- **Remisyon sonrası tedavi:** Bu faz 2 kür konsolidasyon ve 1 kür yüksek doz Ara-C içeren intensifikasyondan oluşmaktadır.

2.1.11.2. Relaps Yapan Veya Refrakter Olgularda Tedavi

Tam remisyon giren hastaların %60'ında relaps gelişir. Relaps yapanlarda yeni bir tedavi ile %40-60 oranında hastada ikinci bir remisyon meydana gelir. Ancak bu remisyonlar kısa sürelidir.

2.1.11.3. Kemik İliği Nakli

Her ne kadar sadece kemoterapi uygulanımı ile sağ kalımda olumlu gelişmeler bildirilse de kemik iliği transplantasyonu en düşük relaps oranları ile antilösemik tedavide en iyi tedavi şekli olmaya devam etmektedir (17,18). Prospektif çalışmalarda görülmüştür ki kemik iliği transplantasyonu sağ kalım açısından kemoterapiden oldukça ileridedir. Relaps oranları KİT’de %15-23 iken kemoterapi sonrasında %64-77 bulunmuştur. Allojenik kemik iliği transplantasyonu en düşük relaps oranları ile en iyi konsolidasyon tedavisi olarak görülmektedir.uygun dönür eksikliği, doku reddi hastalığı toksisite ve enfeksiyon nedeni ile kullanılabilirliği sınırlanır (9).

Uzun yıllar allojenik transplantasyon ancak 40-45 yaş altındakilere yapılırken bu gün gelişmiş transplantasyon merkezleri 55 yaşa kadar olanları bu programa almaktadır. İster allojenik ister otolog KİT yapılsın, en önemli sorun transplantasyon komplikasyonları nedeniyle hastaların kaybedilebilme riskidir. Bu risk allojenik transplantasyonda %30, otolog transplantasyonda %10 dur. Ayrıca KİT başarılı olsa bile hastaların bir kısmında bir süre sonra relaps gelişmektedir. Tüm bu sorunlara karşın ilk remisyon sonrası KİT yapılanlarda hastaliksız sağ kalım süreleri konvansiyonel kemoterapiye biraz daha üstün gözükmektedir. Allojenik transplantasyonda hastalığın ortadan kalkma mekanizmasında 2 faktör rol oynar. Bunlardan ilki KİT öncesi yapılan yüksek doz kemoterapi ve/veya radyoterapidir. 2. mekanizma ise graft versus host hastalığında (GVHH) rol alan donör lenfositlerin yarattığı ve “graft versus lösemi (GVL)” olarak bilinen anti lösemik etkidir. Otolog transplantasyonlarda kemik iliğindeki rezidü lösemi hücrelerinin kişiye tekrar verilmemesi için bu hücreler in vitro ortadan kaldırılı bilmektedir (Purging). Purging işleminin ne derece etkili olabildiği henüz kesinlik kazanmamıştır (8).

Remisyonadaki hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada allojenik KİT yapılan hastalar, yüksek doz cytarabine ve metilprednizolon eşliğindeki cytarabine ile kıyaslanmış olup relaps oranı allojenik KİT yapılan hastalarda daha düşük bulunmuştur (16).

2.1.12. Tedavide yeni umutlar-~~Normal~~ Ve Lösemik Hematopoietik Hücre Diferansiasyonu

Normal hematopoietik sistemde kök hücreler sınırlı bir büyüme potansiyeline sahip olan ve matür kan hücrelerini oluşturan progenitör hücrelere dönüşürler. Bunun yanında dönüşüm göstermeyen (non-cycling) durumda saklanan ancak dönüşüm kapasitesine sahip kök hücrelerde bulunur. Fizyolojik veya patolojik durumlarda üretilen sitokinler kök hücrelerin hayatta kalmalarında ve proliferasyonlarında rol oynarlar. Ayrıca myeloid diferansiasyonunda etkileyebilirler. Sitokinlerin reseptörlerinin proliferasyon ve diferansiasyon için farklı sitoplazmik bölgeleri (domain) bulunur. Eğer bu sitokinlerin reseptörleri veya bu reseptörlerin sitoplazmik bölgeleri mutasyona uğrarsa farklılaşma sinyalini vermeyip yalnızca büyüme sinyali verebilir. Normalde G-CSF reseptörünün sinyali ile bilinmeyen mekanizmalar sayesinde farklılaşmanın oluşmasına izin verecek şekilde hücre siklusunun G1 fazı uzamaktadır (19).

M-CSF reseptörünün tirozin 807 bölgesinin otofosforilasyonunun büyüme ve farklılaşma arasındaki dengeyi sağladığı gösterilmiş olup bu bölgedeki mutasyonların myeloid prekürsör hücre serilerinin (FDC-P1) M-CSF'e bağlı farklılaşmasını tamamen ortadan kaldırdığı bildirilmiştir. Ayrıca bu bölgedeki mutasyon, proliferasyonunun sitimülasyonu ve farklılaşmanın süpresyonu yolu ile lösemiye sebep olabilmektedir (20).

Hematopoietik hücrelerin hayatta kalış, proliferasyon ve diferansiasyonunda sitokinlerin etkisi moleküler düzeyde etkili DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörlerine bağlıdır. Bu transkripsiyon faktörleri immatür hücreden matür hücreye doğru gelişen hücrelerdeki spesifik genlerin ekspresyonunu kademe, kademe düzenleme şeklinde etkinlik göstermektedir. Bu transkripsiyon faktörleri hematopoietik yolların ayrılmasında da temel rol oynamaktadır. Örneğin GATA-1 in yokluğu eritroid seri gelişimini engellerken GATA-2 nin yokluğu hematopoez de bozulmaya sebep olabilmektedir. Yine diğer bir transkripsiyon faktörü olan Lenfoid Faktör İkarusun yokluğunda farelerde T ve B lenfositlerinin ve onların öncülerinin gelişemediği bildirilmiştir (21).

Normal hücreler gibi lösemik hücrelerde, nadir istisnalarına rağmen hayatta kalma ve büyümeleri için sitokinlere bağımlıdırlar. Bu sitokinler lösemik hücreler veya başka hücreler tarafından üretilmektedirler. Normal olarak myeloid proliferasyon ve farklılaşma sırasında

proliferasyon bir noktada durmakta ve bu noktada farklılaşmanın tamamlanmasına doğru hücreler ilerlemektedir. Sonuç olarak diferansiye olmuş hücreler Apoptozise (programlanmış hücre ölümü) uğramak suretiyle ölmektedirler. Maturasyon ve ölüm olaylarının her ikisinin bozulması ile gelişimini tamamlamamış, anormal fenotipik karakterde, değişik lösemik blastların ortaya çıkışı ve bunların artışı ile AML ve diğer lösemiler oluşmaktadır. Sonuçta AML'deki anormal maturasyon; transkripsiyon faktörlerinin, sitokin reseptörlerinin hücre siklusunun ve normal genetik farklılaşma programının bozulması sonucu oluşmaktadır (22).

2.1.13. AML'de Diferansiasyon Tedavileri

AML'nin alt grubu APL'li hastaların tedavisinden elde edilen sonuçlar AML hücrelerinin farklılaşmasındaki duraksamanın bazen ortadan kaldırılabilirdiğini göstermiştir. Sachs ve arkadaşlarının çalışmaları myeloid lösemik hücrelerin matür granülositlere ve makrofajlara farklılaşma için indüklenebileceğini göstermiştir (22).

Farklılaşmayı indükleyen ajanlarla ilgili yapılan araştırmalarda insan myeloid lösemik hücre serilerinde HL60 (myeloblastik) , U-937 (monoblastik) hücreler kullanılmış ve diferansiasyonun Retinoik asit (RA) , lenfositlerin ürettiği sitokinler , TNF , vitamin D3 ve kimyasal bileşiklerin bir kısmı ile sağlandığı bildirilmiştir. Farklılaşma yapan ajanlar farklı mekanizmalar üzerinde etkinlik göstermekle beraber, malign yapının düzeltilmesi ancak malign hücrelerdeki genetik bozuklukların düzeltilebilmesi ile mümkün olabilmektedir(22).

APL hastalarına verilen ATRA ile lösemik hücreler ortadan kalkmakta ve bunların yerini lösemik olmayan nötrofiller olmaktadır. Böylece klinik olarak remisyon izlenmekte ancak bir süre sonra yeniden relaps görülmektedir. Sonuç olarak farklılaşmanın indüksiyonu malign klonun ortadan kaldırılmasını sağlamamakta ancak normal ve lösemik hücreler arasındaki dengeyi sağlamaktadır. Bu sayede normal hematopoezdeki inhibisyon geçici olarak ortadan kaldırılabilir. Sağlanan remisyon süresinin devamı ise, konsolidasyon kemoterapisinin tedaviye eklenmesi ile mümkün olmaktadır (23).

Farklılaşma tedavisi ile başarılması umulan nedir? APL'de ATRA uygulamasında olduğu gibi malign hücrelerin AML'li hastalarda tamamen gözden kaybolması mümkün değildir. Ancak lösemik hücrelerin sayısında bir azalma ve normal hematopoezin sağlanması ile klinik remisyon elde edilebilmektedir. Böylece proliferasyon ve diferansiasyon arasında

yeni bir denge oluşturulabilmektedir. Sonuç olarak hastayı tedavi etmek için önce farklılaşmayı sağlayan ilaçlar verilmeli takiben standart kemoterapi uygulanmalıdır. Eğer hücreler farklılaşma tedavisine rezistan hücreler ise yine standart kemoterapiye cevap alınabilmektedir. Bu iki ilacı kombinasyonu rezistan hücrelerin gelişimini ve lösemik relapsı azaltmakta buna karşın klinik remisyonu anlamlı derecede uzatabilmektedir.

2.1.13.1 All-Trans Retinoik Asid (ATRA)

Retinol, retinoik asid ve retinal hayvansal kaynaklı byolojik aktivite gösteren ve A vitamini genel terimi altında toplanan bileşiklerdir. A vitamini bir lipoglikoprotein kompleksi şeklinde karaciğer lipozitlerinde depolanmaktadır. Dokulara transportu ise hidrolize olduktan sonra retinol ve apo retinol bağlayıcı proteine (RBP) bağlanarak olmaktadır. Sonuçta meydana gelen holo RBP golgi apareyinde işlenilerek plazmaya salgılanınca retinoik asid plazmada albumine bağlı olarak hücrelere aktarılır (24). Hücre içine pasif difüzyonla giren retinoik asid, sellüler retinoik asid bağlayan protein ile birleşir. Oluşan bu bileşik düz endoplazmik retikulumda lokalize stokrom P 450 enzimleri ile metabolize edilir. Metabolize olmayan retinoik asid hücre nükleusundaki retinoik asit reseptörlerine bağlanır. Aktive olmuş reseptörler spesifik DNA segmentlerine etki göstererek m RNA transkripsiyonuna neden olur. Böylece retinoik asidin hücre içi cevabı meydana gelir.

AML'deki diferansiasyon tedavisinin klinik özelliklerinin en göze çarpıcı başarısı akut promyelositik lösemi (APL)'de gözlenmiştir. ATRA, APL'li hastaların yüksek oranında komplet remisyona sebep olmaktadır. ATRA'ya karşı oluşan hücresel cevap lösemik hücrelerin diferansiasyonlarının indüklenmesine bağlanmaktadır. Bu olay hem kemik iliğinde hem de periferik kanda gerçekleşmektedir. ATRA ile tedavi edilen hastalarda promyelosit ve nötrofiller arası maturasyondaki ara hücreler gözlenebilmektedir. Oluşan ara hücrelerin en baskın özellikleri çentiklenmiş nükleusları, azurofilik granüllerindeki kayıp ile nükleer ve stoplazmik vakuolizasyonun meydana gelmesidir (25).

APL vakalarının yaklaşık %80'inde t (15;17) bulunmaktadır. 17. kromozom üzerindeki nükleer retinoik asit reseptör geni ile 15. kromozom üzerindeki PML (promyelosit lösemi) geninin füzyonu sonucu PML/RAR α füzyon geni oluşmaktadır. Bu genin oluşturduğu transkriptin APL patogenezindeki rolü açık değildir. RAR α (retinoik asit

reseptörü) RA in hücresel düzeyde diferansiasyon yapıcı etkisine aracılık etmektedir . PML/RAR α geni normal RAR α fonksiyonunda inhibisyon uluşturdüğundan hücre diferansiasyonu için RA in normal olarak serumda bulunan miktarı (10^{-8} - 10^{-9} M) yetmemekte çok daha yüksek dozlarına (10^{-6}) ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte bu hipotez RAR'ın fonksiyonel assay lerinde tam olarak gösterilememiştir (7).

ATRA invivo ve invitro olarak APL hücrelerinin matür granüositlere doğru diferansiye olmalarını uyarmaktadır. APL genellikle ATRA ya böyle bir tedavi cevabı veren tek AML alt tipidir. APL de ATRA kullanımı ile %90'dan büyük bir oranda klinik olarak tam remisyona yol açmakta olup (26-28) bu hastalığın tipik özelliği olan koagulopatinin hızla düzelmesini sağlamaktadır (28,29).

Hücre dizilerinde görülen rezistans RAR α 'da gelişen nokta mutasyonları veya PML-RAR α proteinin değişik ekspresyonlarının ortaya çıkışı ile ilişkilidir. Bu olay klinik olarak rezistans kabul edilen hastalardan elde edilen örneklerde de gösterilmiştir. Pek çok merkezde ATRA tedavisi remisyon indüksiyonundan sonra verilemektedir. Antrasiklin içeren kombine kemoterapi konsolidasyon olarak daha sonra uygulanmaktadır. Bu kombine kemoterapi ile APL'li hastalarda relapsız sürede anlamlı derecede yükselme tespit edilmiştir. Bu tedavi rejimleri ile yeni tanı konmuş vakaların yarısından çoğunda tam düzelme sağlanabilmektedir. ATRA'nın tek başına kullanımı ile APL'li hastalarda bazı diğer hastalıklarda artma gözlenmiştir. Gliomaların ve kazanılmış immun yetmezlik sendromu ile ilişkili Kaposi's sarkomasının ortaya çıkışında hafif bir artışa sebep olduğu bildirilmiştir(30).

Aktivator	DNA bağlayan Kısım	Hormon Bağlayan Kısım
-----------	--------------------	-----------------------

Şekil 1: ATRA reseptörü (33).

ATRA ayrıca APL hücreleri üzerinde klonal proliferasyonu invivo ve invitro olarak hücre siklusu üzerinden inhibe edici etkinlik gösterebilmektedir(31). .ATRA'nın APL hücreleri üzerindeki bilinen etkileri dışında diğer AML hücreleri üzerinde bcl-2

ekspresyonunu down regülasyona uğratmak suretiyle hücre ölümünü indükleyebilmektedir. ATRA sitotoksik ilaçlara karşı lösemik hücrelerin duyarlılığını artırabilmekte ve bazı AML'li hastalarda kemoterapi kombinasyonlarında kullanılabilir (32).

ATRA ile yapılan araştırmalarda çeşitli sonuçlar alınmıştır. Bunlardan en dikkat çekici özelliği lösemik hücre diferansiasyonunu indükleyebilmesidir. Bunu çeşitli yollardan yapabilmektedir. Örneğin lösemik hücre diferansiasyonunda önemli rol oynayan nitrik okside ATRA endojen olarak uyarıcı etki yapabilmektedir (34). Yine granülositik diferansiasyon sırasında fosfatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) 'ın nukleer seviyesinin arttığı ve bunun ATRA tedavisi sırasında da arttığı gösterilmiştir (35). Retinoik asitlerin tedavide kullanılmasının bir diğer özelliği hücre siklusu üzerine etkileri ve apoptozisi indükleyebilmesidir. NB 4 (Akut promyelositik lösemi) hücreleri üzerinde, bir sentetik retinoid olan CD 437 denenmiş ve S fazındaki hücreler üzerinde apoptotik etki yapabildiği bildirilmiştir (36). ATRA'nın sıçan meme epitel hücrelerini S fazında azaltıcı ve diferansiasyonu indükleyici etkisi vardır (37). NB 4 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada bu hücrelerin S fazındaki yüzde oranını %29-52 oranında düşürdüğü bildirilmiştir (38).

ATRA'nın bir diğer dikkat çekici özelliği malign hücreler üzerindeki antiproliferatif özelliğidir. Yapılan bir çalışmada multiple myelomalı hastaların plazma hücrelerinin proliferasyonunu invitro olarak inhibe ettiği bildirilmiştir (39).

2.1.13.2. Vitamin D3

Vitamin D'nin aktif metaboliti 1, 25 (OH)₂ D₃'tür. Bu hormon, diyetle doğrudan alınabileceği gibi 7-dehidrokolesterolün deride ultraviyole ışınlarının etkisiyle vitamin D₃'e dönüşmesiyle oluşur. Vitamin D₃ karaciğerde 25 hidroksillenerek 25 (OH) D₃'e çevrilir. Vitamin D'nin bu formu fizyolojik olarak düzensiz, orta derecede bir biyolojik aktiviteye sahiptir. Bu prekürsör daha sonra, proksimal tübül hücrelerindeki mitokondrilerde 1 α -hidroksidaz tarafından biyolojik bakımdan çok daha aktif olan forma, yani 1, 25 (OH)₂ D₃'e dönüştürülür (40).

Plazmasa dolaşan 1, 25 (OH)₂ D₃, %99'un üzerinde proteine bağlıdır. Barsak, kemik, paratiroid bezi, böbrek, meme ve myeloid hücrelerde hedef reseptörleri bulunur (40). Vitamin D₃ reseptörü steroid reseptör ailesinin bir üyesidir. Bu reseptörün ligant bağlayıcı bölgesi,

vitamin D3'ü yüksek bir afinite ve düşük bir kapasite ile bağlamaktadır. Bu bağlanma satüre edilebilir, spesifik ve reversibl olabilen bir bağlanmadır. Çekirdekte vitamin D3 reseptörünün kromatine bağlanması ile ilgili gözlem, vitamin D3'ün gen transkripsiyonunu ve spesifik mRNA'ların oluşumunu uyardığını telkin etmektedir. Kalsiyum bağlayıcı bir proteinin kodlanmasını yapan mRNA'nın indüksiyonu ile ilişkili böyle bir örnek bildirilmiştir (33).

Vitamin D3; bazı tümör tiplerinin insidansını azaltabilmektedir. Lösemi, meme, kolon ve prostat kanser hücre dizilerinde büyümeyi azaltmaktadır. Fakat bu etkilerin hücre diferansiasyonu ile ilişkisi açık değildir. HL 60 hücrelerinde vitamin D'nin hücre diferansiasyonu arttırdığı bildirilmekle beraber hiperkalsemi yapıcı etkinliği bu ilacın klinik uygulamalarını sınırlandırmıştır (25).

Hiperkalsemi yapıcı etkinliği azaltılmış yeni jenerasyon vitamin D analogları günümüzde araştırılmaktadır. Bir çalışmada HL 60 hücre serilerinde bu analogların etkinliği araştırılmış 11 analogdan 9'unun düşük dozlarda bile (10^{-8} - 10^{-11} Mol/L) klonal inhibisyona yol açabildikleri bildirilmiştir (41).

Vitamin D3 U937 hücrelerinin monositik diferansiasyonunu indükleyebilmekte ve G0/G1 hücre siklusunu bloke edebilmektedir (42). Yine vitamin D3 değişik kanser hücre dizilerinde diferansiasyonu indükleyici ve büyümeyi inhibe edici etki göstermektedir (43). Bir çalışmada vitamin D3'ün, HL 60 lösemi dizileride aldoketoredüktaz enzim aktivitesini inhibe etmek yoluyla hücre diferansiasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (44). Yine vitamin D3'ün malign hücreler üzerine olan antiproliferatif etkiside oldukça belirgindir (45).

AML'li hastalardan elde edilen hücreler üzerinde yapılan bir çalışmada bir vitamin D analogu olan KH 1060 denenmiş ve sonuçta hücre viabilitesini azaltıcı, klonal büyüme ve proliferasyonu inhibe edici etki gösterdiği bildirilmiştir (46).



Şekil 2: Vitamin D3'ün reseptörü (33).

2.1.13.3. Deksametazon

Glukokortikoidler (GK) adrenal korteksten sentezlenen ve bir çok fizyolojik olayın düzenlenmesinde önemli rolü olan steroid yapıda hormonlardır. Dört halkalı yapıya sahip olan siklopentanoperhidrofenantren iskeletinden türeyen maddeler için steroid deyimi kullanılır. K'lar' hücre mebranındaki lipidler arasından basit difizyonla hücre içine girer. GK'ların etki gösterebilmeleri için spesifik reseptörü ile birleşmesi gerekir. GK reseptörlerinin, aktif olmayan şekli, 310.000.000 dalton'luk kitleye sahip heteromer kompleks şeklinde sitozolde bulunur. Bu heteromer kompleks 2 adet 90.000.000 dalton ağırlığa sahip ısı şoku proteinleri (HSP-90) ve 59.000 dalton ağırlığa sahip olan P 59 proteini içerir. Reseptör; hormonunun bağlandığı alan DNA'nın bağlandığı alan ve antijenik-immunolojik alan olmak üzere 3 bölgeden meydana gelir (47).

GK'lerin metabolik etkilerinin yanında bazı hematolojik etkileri de vardır. Fizyolojik dozlarda hemogloblin sentezini artırarak eritrosit sayısını yükseltirler. Farmakolojik dozlarda ise lökosit migrasyonunu ve antikor sentezini inhibe ederek immun cevapları suprese ederken, kandaki polimorfonükleer lokosit ve trombosit sayısını artırır. GK'ların arttığı durumlarda lenfosit, eozinofil, bazofil ve monosit sayısı azalır (48).

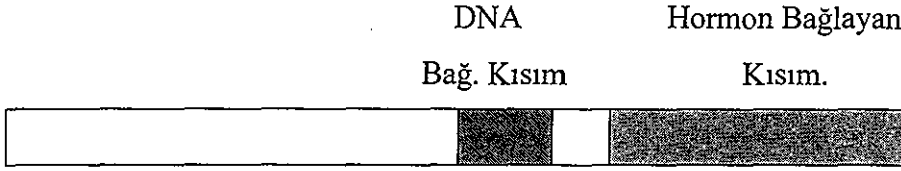
GK'ler DNA ve kromatinde fragmantasyon, hücre yapısında bozulma ve sitoplazmik proteinlerde değişim sonucu hücre ölümüne sebep olabilirler. Bununla birlikte gen transkripsiyonu sonucu yeni hücre yüzey belirleyicileri oluşmakta ve fagositoz oluşumuna neden olmaktadır (49-51).

Apoptotik aktiviteyi azaltan sitokinlerin etkilerini azaltarak supresif veya apoptotik aktiviteyi uyaran protoonkogenlerin etkilerini düzenleyerek GK'ler apoptozisi indirek olarak uyaramaktadır (52-54). Hematolojik malign hastalıklarda, başlıca hücre lizisi etkisinden yararlanır. Bu etkinin oluşmasında apoptozisi uyarması ve hücre siklusunu bloke etmesinde önemli rol oynar (55-61). Ayrıca lösemik hücre diferansiasyonunda sağlayabilmektedir (58,59). Bu etkiler dozlar arttıkça daha belirgin hale gelmektedir. (60,61).

Myeloid lösemnin diferansiasyon tedavisinde kullanılan glukokortikoidlerin etkisi iki şekilde gözlenmektedir. Birincisi ; direkt lösemik hücrelerde diferansiasyon yapıcı etkisi, ikincisi ise; diferansiasyonu indükleyen sitokinlerin oluşumunu suprese etmeleridir (62).

Deksametazon ile yapılan çalışmada HL 60 hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve çeşitli sonuçlar elde edilmiştir (63).

Glukokortikoidlerin bazı lenfoid lösemi hücrelerinin apoptozisine neden olduğu gibi AML nin bazı tiplerinde apoptozisi indükleyebildiği rapor edilmektedir. Bir çalışmada deksametazonun AML hücrelerindeki apoptozisi indükleyebildiği bildirilmiştir (64). Bu etkinin hücre dizilerindeki glikokortikoid reseptör gen ekspresyonunu artırmak suretiyle yaptığı düşünülmektedir (65).



Şekil 3: Glikokortikoid reseptörü (33).

HL 60 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada deksametazon tedavisi ile bu hücrelerdeki apoptozisin indüklendiği ve bunun apoptozisi inhibe eden bcl-2 geninin down regülasyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir (66).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma KTÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları kliniğinde yatan AML'nin M3 tipi haricindeki diğer tiplerinden tanı almış hastalardan elde edilen AML hücreleri ile hematoloji laboratuvarı sistemlerinden yararlanılarak yapılmıştır.

Hastalardan elde edilen AML hücre dizilerinde ATRA, vitamin D3 ve deksametason un doza bağlı etkilerini araştırmak üzere planlanan bu çalışma için 1996-1998 yılları arasında İç Hastalıkları kliniğinde M3 tipi hariç diğer AML tiplerinden tanı konmuş ve henüz tedavi görmemiş 20 hasta alındı. Bu hastalardan elde edilen kemik iliğlerinden bir kısmı hücrelerin saklama koşullarından dolayı kullanılamadı. Bazı hastalardan elde edilen hücrelerin ise sayısı yeterli değildi. Sonuç olarak çalışma grubuna sayıları ve durumları yeterli 7 hastadan elde edilen hücreler dahil edildi

Tablo 1 de özellikleri belirtilen hastaların yaşları 34 ile 70 arasında olup 4'ü kadın , 3'ü erkekti.

Bu çalışmada kimyasal maddeler olarak Retinoic Acid (Sigma, Lot 98F0778), Dexamethasone (Sigma, Lot 28H1188), Devit-3 ampul (Deva), Ficoll-Hypague (Lymphocyte separation medium Gibco BRL.), RPMI medium 1640 (041-01875 M Gibco), Fetal Calf Serum (011-06290 H Gibco), Penicilin-Streptomisin (061-5140 Gibco), heparin (Liquemine, Roche), DNA prep reagents (Coulter PN 6604452: 3x70mL DNA prep stein, 1x22mL DNA prep LPR, 1x0.5mL DNA-prep reference), Serum Fizyolojik (SF) %0.9, PBS (Phosphate buffered saline: 0.8 gr NaCL, 0.144 gr Na₂ HPO₄, 0.02gr KCl, 0.02gr KH₂ PO₄ 80ml distile su), TBE solüsyonu: Tris base 54gr, Boric acid 27.5gr, 0.5 m EDTA 20ml, Nonidet (NP 40 Sigma N-6507), Rnaz A (sigma R 4875), Proteinaz K (Sigma P 4914), Loading buffer: %0.25 bromfenol blue, %0.25 Xylenecyanol, %30 glycerol, Agarose jel (Sigma A-9539), Ethidium bromide (Sigma E-8751) den faydalanıldı.

Bunlara ilave olarak; Laminer air flow (Powtech), zaman ayarlı soğutucu santrifüj (Hettich-Rotina35R), PCO₂ inkübatör (Jouan IG 150), Kan sayım cihazı (System 9000 Hematology Analyzer), Otoanalizör (Technican RA-X Serono), Epics Elite-ESP Flowcytometry (Coulter), DNA prep workstation (Epics Leucoyte Prepration Workstation, Coulter), Multicycle DNA analiz programı (Phonenix Flow systems), Corning Cell Wells (24 Well 25820), Corning Cell Flaks, Pastör pipeti, Steril disposable farklı büyüklükte enjektörler, Steril santrifüj tüpü (Nunc 348232 mm vida kapaklı), Steril 15ml'lik konik tüp, cama yazar kalem, Beher, Elektroforez tankı (Hoefler-HE 33), Ultraviole lambası (Haefer Nighty Bright UVTM-19) Binoküler araştırma mikroskobu (Olympus CHS No 7e0133), Invert Mikroskop (Olympos CK2) dan da yararlanıldı.

Aşağıda detaylı olarak belirtildiği gibi içerisinde değişik dozlarda ATRA, vitamin D3 ve deksametason bulunan kültür ortamındaki AML hücreleri üzerinde bu ilaçların değişik dozlarının etkileri araştırıldı.

Tablo 4: Çalışmaya Alınan Hastaların Özellikleri ve AML Tipleri

Ad-Soyad	Protokol No	Yaşı	Cinsiyeti	AML altı tipi
H.C	478056	70	Erkek	M5
R.K	393602	34	Bayan	M4
M.E	475929	45	Erkek	M2
B.Ö	478023	55	Bayan	M1
S.Y	483910	53	Erkek	M2
Z.B	487070	55	Bayan	M2
H.D	476020	60	Bayan	M2

3.1. Hücrelerin Hazırlanması

Hastalardan AML hücresi elde etmek için, spina iliaca anterior superior dan steril heparinize (50µl/ml) enjektör ile kemik iliği alındı.

Alınan kemik iliği iki kat hacimdeki PBS solüsyonu ile dilüe edildi elde edilen karışım süspansiyonu içinde Ficoll Hypaque bulunan tüpün üzerine yavaşca yayıldı ve oda sıcaklığında 600g'de 25 dakika santrifüj edildi (Ficoll dansite gradyent yöntemi). Orta tabakadaki hücreler toplandı ve 2 kez HBSS ile yıkandı. Elde edilen nonadherent

mononükleer hücreler içinde AML blastlarının oranının en az %70 olduğu kontrol edildi ve bu hücrelerin canlılık oranının en az %96 olduğu Acridin Orange boyası ile hazırlanmış preparatların immün floresans mikroskopik değerlendirilmesi ile gösterildi.

3.2. İlaçlar

ATRA %100 etanol içinde çözüldü ve 1mMol/L'lik stok solüsyonu hazırlanarak -20 °C'de ışıktan korunarak saklandı (67). Vitamin D3 absöü etanolde çözüldü ve 1mMol/L'lik stok solüsyonu -20 °C' de saklandı (68). Deksametazon absöü etanolde çözüldü (69) ve 0.1mMol/L'lik stok solüsyonu hazırlandı ve 4 °C'de bekletildi.

3.3. Hücre Kültürü

Çalışmamızda RPMI 1640, %10 inaktif fetal calf serumu ve 100 ünite/ml kristalize penisilin, 100µg/ml streptomisin den oluşan hücre kültür vasatı kullanıldı. İki adet 24 lük hücre kültür plağı alınarak aşağıdaki gibi değişik dozlarda ilaçlar eklendikten sonra hazırlanan kültür medyası içindeki hücreler kültür plağının her kuyucuğuna son volümü 2'şer ml olacak şekilde ve her bir kuyucuğa 1 milyon hücre düşecek şekilde her grup için toplam 4 kuyucuk kullanıldı. Hazırlanan kültür ortamı 72 saat süre ile %5 Co₂ basıncı altında 37 °C'de inkübatöre kaldırıldı. 72. saatin sonunda sonuçlar değerlendirildi.

- 1- Grup A: Kontrol grubu (Her bir ilaç kadar absöü etanol=%0,01)
- 2- Grup B: ATRA 500nMol/ml
- 3- Grup C: Vitamin D3 500nMol/ml
- 4- Grup D: Deksametazon 50nMol/ml
- 5- Grup E: Deksametazon 100nMol/ml
- 6- Grup F: Deksametazon 150nMol/ml
- 7- Grup G: ATRA 500nMol/ml + Vitamin D3 500nMol/ml
- 8- Grup H: ATRA 500nMol/ml + Deksametazon 50nMol/ml
- 9- Grup İ: Vitamin D3 500nMol/ml + Deksametazon 50nMol/ml
- 10- Grup J: ARTA 500nMol/ml+Deksametazon 50nMol/ml+Vitamin D3 500nMol/ml

3.4. Sonuçları Değerlendirme Yöntemi

İnkübasyon sonrasında, hücreler üzerinde aşağıdaki parametrelere bakıldı.

3.4.1. Hücre Sayısı

72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin sayısı kan sayımı cihazı ile ölçüldü.

3.4.2. Apoptozisin Saptanması

İlaç gruplarındaki hücrelerin apoptozis oranları saptanırken aşağıdaki yöntemler kullanıldı.

3.4.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu kültür edilmiş lösemik hücrelerden DNA izolasyonu NucleoSpin Blood (MACHEREY-NAGEL) Cat No: 740951 kiti ile yapıldı. İzolasyonda 200µl hücre solüsyonuna 25µl proteinaz K ve 200µl B3 (guanidine hydrochloride + non iyonik deterjan) ilave edildi. 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi 210µl soğuk etanol ilave edildi. 6000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Çift filtre sisteminde aşağıya geçen kısım atıldı. Üstteki filtrelili tüpe 500µl BW (washing buffer) ilave edildi. 6000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Alt kısım atıldı. Üst kısma 700µl B5 (etanol + noniyonik deterjan) solüsyonu ilave edildi 6000xg'de santrifüj edilip alt kısım atıldı. Bu aşama iki kez tekrar edildi. (300µl B5 ve 8000xg'de 2 dakika) Sonra alttaki tüpler değiştirildi ve 70 °C'de 5 dakika beklemiş BE (elution buffer-trisHCL) solüsyonundan her filtrelili tüpe 100µl ilave edildi. 6000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada filtreye takılmış DNA'lar alt tüpe geçtiler. Bu yöntemle 200µl lösemik hücre solüsyonundan yaklaşık 50ng DNA izole edildi. İzole edilen bu DNA'lar aliyotlanarak -20 °C'de uzun süre saklanabilmektedir.

3.4.2.2. Agoroz Jel Elektroforezi

08gr agaroz 100ml 1XTBE (Tris Borate EDTA solüsyonu) içinde çözülüp mikrodalga fırında kaynatıldı. Jel 60 °C civarına indiği zaman ortama 10µl etidyum bromür ilave edildi (1µg/ml). Jel kabına döküldü. 25-30 dakika sonra taraklar sökülerek elektroforez tankına yerleştirildi. Kuyucuklara loading buffer ile DNA lar (10µl) ekildi. 75 V' da 1XTBE'li ortamda 60-90 dakika yürütüldü. Sonra UV transilluminatör'de incelenip poloroid kamera ile fotoğrafı çekildi.

3.4.2.3. Flow Cytometri İle DNA İndeksleri Ve Apoptozisin Saptanması

Hücrelerin G₀/G₁, G₂/M ve sentez safhasındaki yüzdeleri saptanarak, apoptotik pik yüzdesi ölçüldü. Flow cytometri ile çalışma için inkübasyon sonrası elde edilen hücreler, PBS ile yıkandı ve hücre sayıları en az 1x10⁶/ml olacak şekilde ayarlandı. Hücreler daha sonra "DNA-prep work station" da işleme tabi tutuldu. Bu işlem sırasında otomatize olarak 1. solüsyon olan LPR solüsyonu ile hücre membran permeabilitesi artırılarak, 2. solüsyon olan DNA-prep stain ilave edildi. Bu solüsyonda kırmızı floresan içeren promidium iodide (PI) ve ribonükleaz bulunmakta olup, LPR solüsyon ile membranında porlar açılmış hücrelerin DNA ve RNA'sının PI'le boyanması sağlandı. Ribonükleaz vasıtasıyla boyanmış olan RNA'ların ortadan kaldırılması sağlandı. Böylece DNA içeriğinin PI'le işaretlenmesi amaçlandı. 15 dakikalık PI ile inkübasyondan sonra flow cytometri'de X ekseninde PmT-4 peak ve Y ekseninde PmT-4 integral kullanılarak çalışmaya alınacak hücre grupları kapı ile belirlendi. Böylece doubled (çift) hücreler elimine edildikten sonra PmT-4 integral X ekseninde, hücre sayısı Y ekseninde yer alacak şekilde grafiklendirildi. Çıkan sonuçların değerlendirilmesi multi-cycle DNA analiz programıyla yapıldı (70).

PI ile daha az boyanan hücrelerin yaptığı hipodiploidik pik, apoptotik pik olarak belirlendi ve ölçümü multi-cycle DNA analiz programıyla yapıldı. Yapılan çalışmalar PI ile yapılan ölçümlerin apoptozisin saptanmasında en az diğer yöntemler kadar hassas olduğunu belirtmekle beraber (71), flow cytometrik olarak saptadığımız apoptotik pik yüzdesini DNA elektroforezi ile teyit ettik.

3.4.3. Proliferatif İndeksin Saptanması

Apopitozis incelenmesinde kullanılan PI ile boyalı nükleer materyalin flow cytometrik analizi sonucunda aşağıdaki formül gereği oluşan sentez ve mitoz daki hücrelerin toplam hücreye oranının hesaplanması ile belirlendi.

$$\text{Proliferatif indeks (\%)} = \frac{\text{Mitozdaki hücre sayısı} + \text{S'deki hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}}$$

3.4.4. Diferansiasyon Değerlendirmeleri

Diferansiasyon değerlendirilmesinde aşağıda gösterildiği gibi mikroskopik değerlendirme, fagositoz testi ve LAP skorlaması yöntemlerinden yararlanıldı.

3.4.4.1. Mikroskopik Değerlendirme

3 günlük inkübasyondan sonra elde edilen hücreler sitospin santrifüj yapıldı. Elde edilen yaymalar wright ile boyandı. Hücrelerdeki büzüşmeler, kromatin kondansasyon, nükleer fragmantasyon ve stoplazmik kabarıntılar apopitoz olarak değerlendirildi (64). Aynı zamanda matür granülositlere doğru geçiş, nükleer çentiklenme ile granülasyon diferansiasyon olarak yorumlandı.

3.4.4.2. Fagositozun Değerlendirilmesi

Kültür edilmiş hücrelerin 1ml'lik her bir kuyucuğuna 5µl Indian ink ilave edildi. Karıştırılarak 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. 200xg'de 5 dakika cytospin santrifüj edildi. Hazırlanan preparatlar mikroskop altında değerlendirildi. Hücre içinde Indian ink'in siyah renkli partikülleri görüldüğünde hücreler fagositoz yapmış olarak kabul edildi. Sitoplazmasında partikül bulunmayan hücreler non-fagositik olarak kabul edildi (72).

3.4.4.3. LAP Skoruması

Hücre kültür plağından alınan 1cc'lik materyal sitospin santrifüj yapılarak morfolojik değerlendirmeye hazır hale getirildi ve nötrofil alkale fosfataz boyası ile Uluslararası Hematoloji Standardizasyon Komitesinin boyanma standardına göre boyandı ve preparatlar mikroskopik değerlendirmeye alındı. Daha sonra skoruması yapıldı (73).

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Bu tez çalışmasında istatistiksel yöntem olarak non parametrik Wilcoxon signed rank testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi.

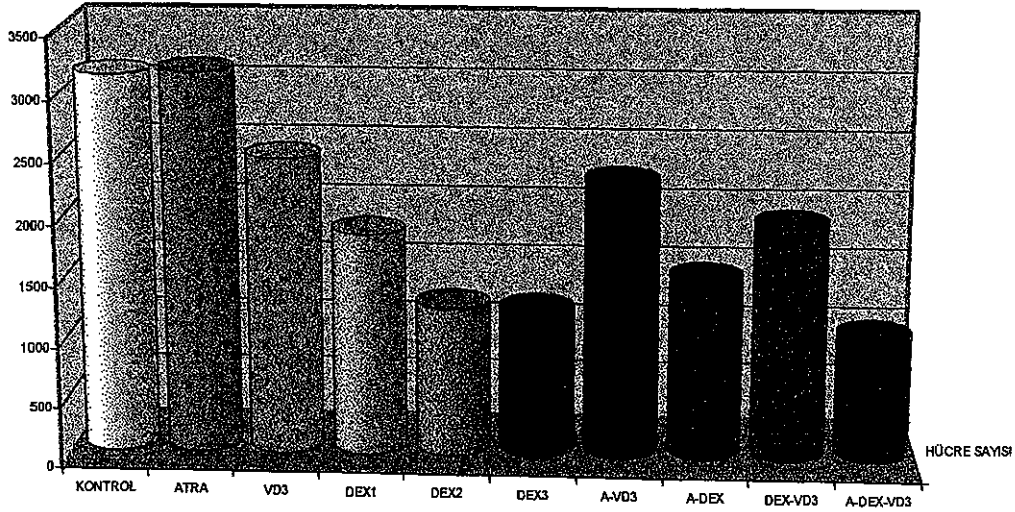
4.BULGULAR

Çalışmaya alınan hastalardan elde edilen akut myeloid lösemi hücreleri hücre kültür ortamında üç günlük inkübasyondan sonra değerlendirmeye alındı. Her bir ilaç grubundaki hücreler üzerinde aşağıdaki parametreler incelendi.

4.1. Hücre Sayısı

ATRA gurubu haricinde tüm gruplardaki hücre sayılarında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma tespit edildi. ($p<0.05$). Grafik 1 ve tablo 5'te gösterildiği gibi inkübasyon sonrası yapılan hücre sayımlarında aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

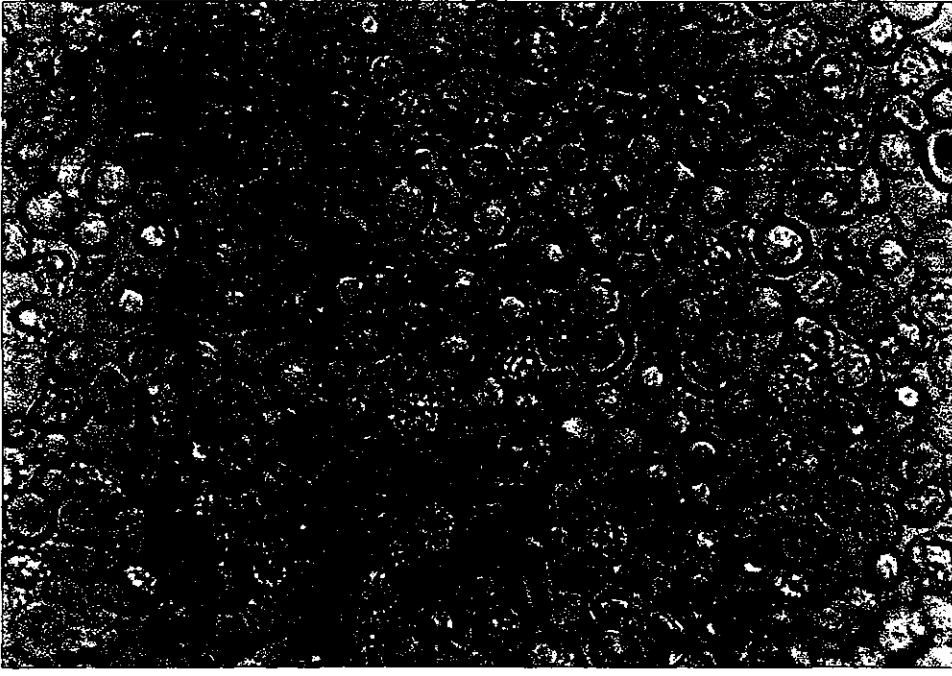
KONTROL= ATRA> VD3= A-VD3> A-DEX= DEX1= DEX-VD3> DEX2= DEX3> A-DEX-VD3 (p<0,05)



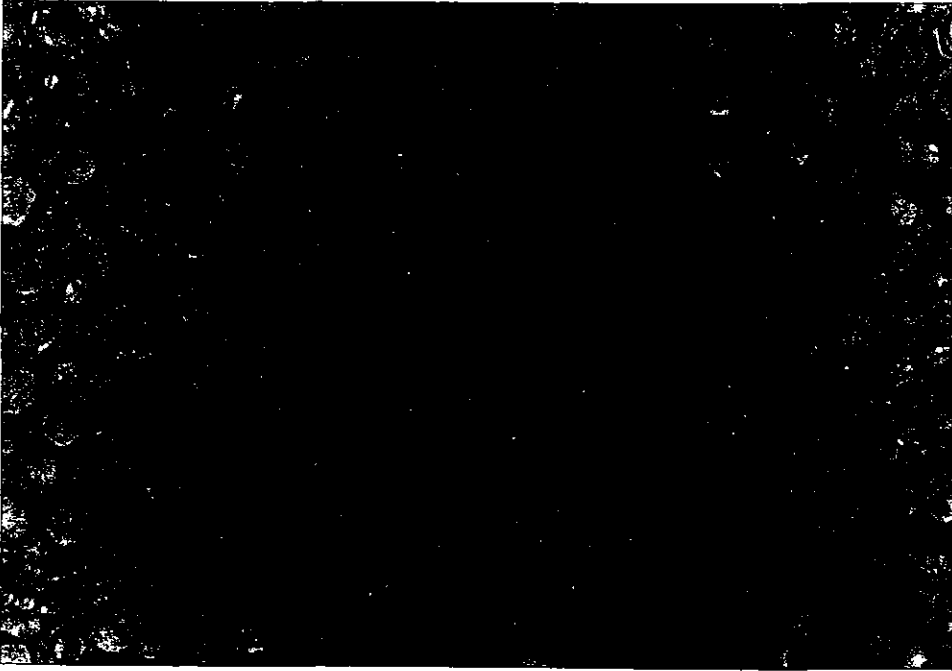
Grafik 1: Hücre sayıları

Tablo 5: Hücre sayıları

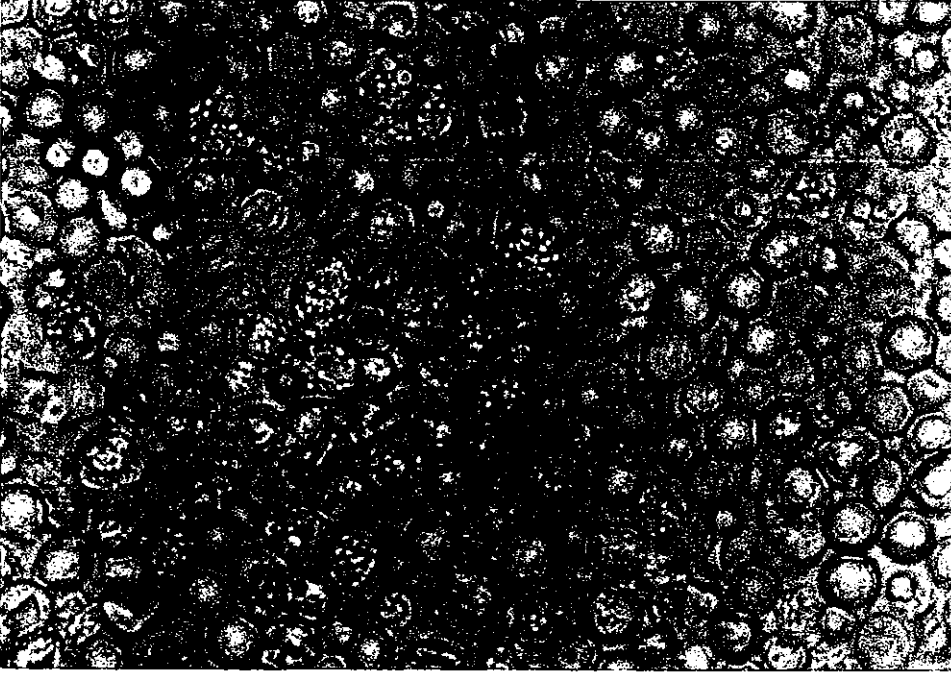
	HÜCRE SAYISI
KONTROL	3128,57±1337.67
ATRA	3157,14±1933.15
VD3	2457,14±1236.33
DEX1	1842,85±1004.00
DEX2	1242,85±464.37
DEX3	1214,28±556.10
A-VD3	2285,71±906.96
A-DEX	1500,00±538.07
DEX-VD3	1942,85±758.39
A-DEX-VD3	1028,57±169.50



Resim 1: Hücre kültürü kontrol grubu



Resim 2 : Hücre kültürü ATRA grubu



Resim 3 : Hücre kültürü DEX-VD3 grubu

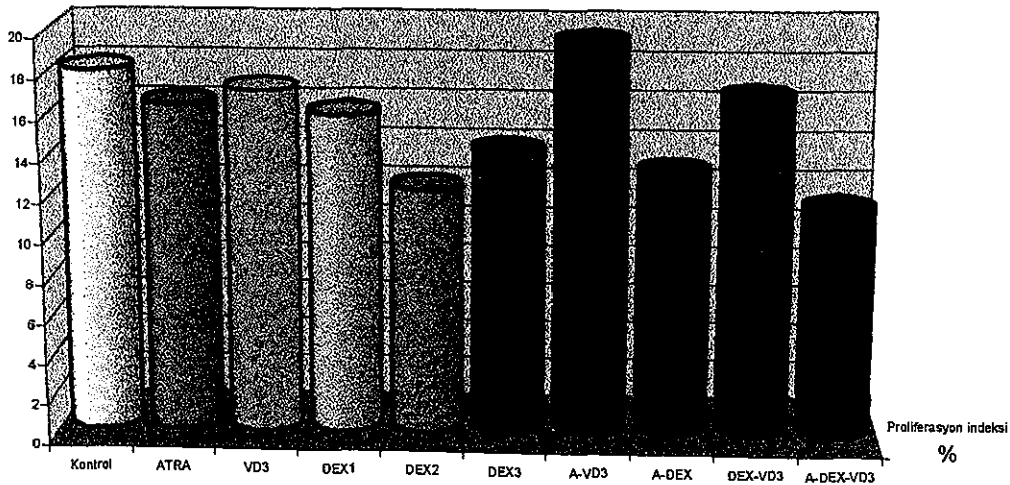


Resim 4 : Hücre kültürü DEX3 grubu

4.2. Proliferasyon İndeksi

Grarafik 2 ve tablo 6’te gösterildiği gibi inkübasyon sonrası grupların proliferasyon indeksleri kontrolle karşılaştırılmış ve aşağıdaki gibi anlamlı farklılıklar bulunmuştur ($p<0.05$).

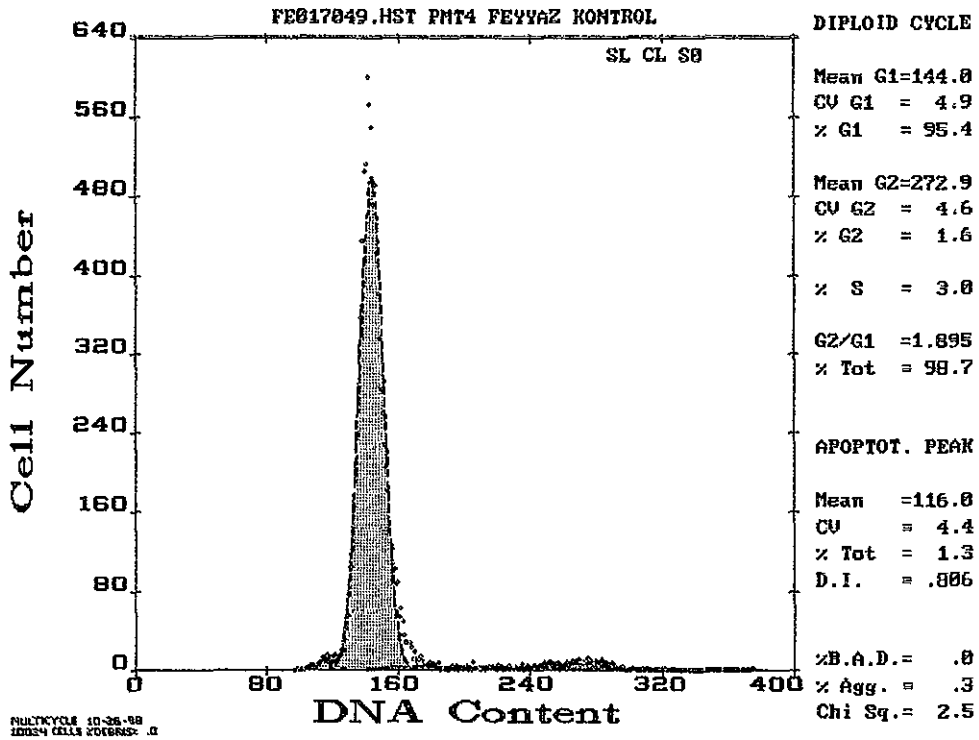
$$\text{KONTROL} = \text{ATRA} = \text{VD3} = \text{DEX1} = \text{A-VD3} = \text{DEX1-VD3} > \text{DEX2} = \text{DEX3} \\ = \text{A-DEX} = \text{A-DEX-VD3} \quad (p<0,05)$$



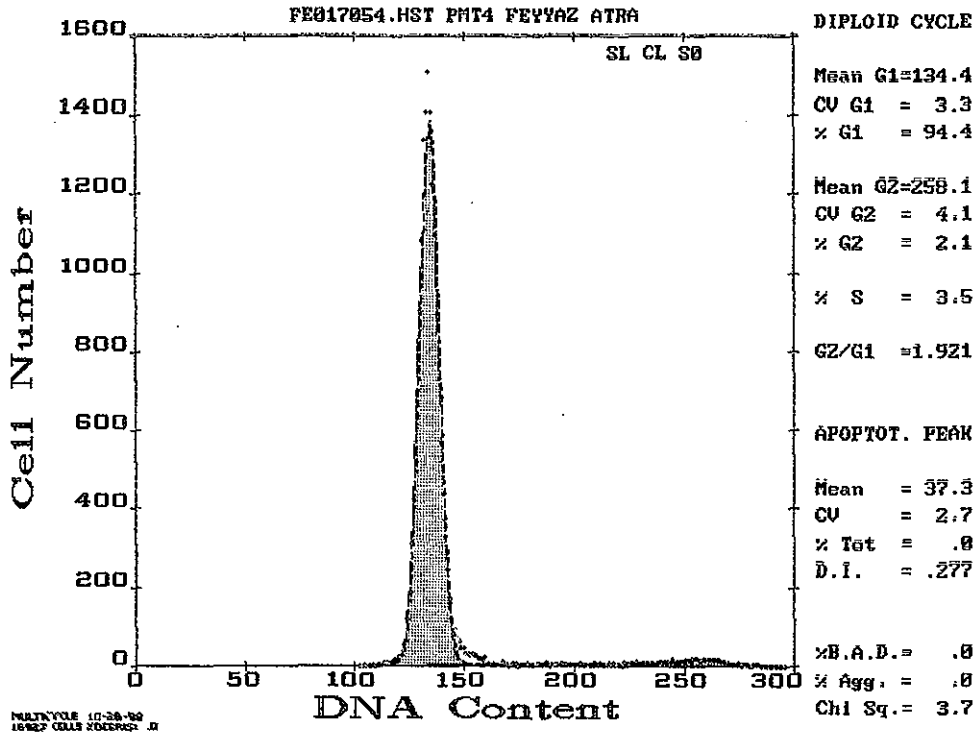
Grafik 2 : Proliferasyon indeksleri

Tablo 6: Proliferasyon indeksleri

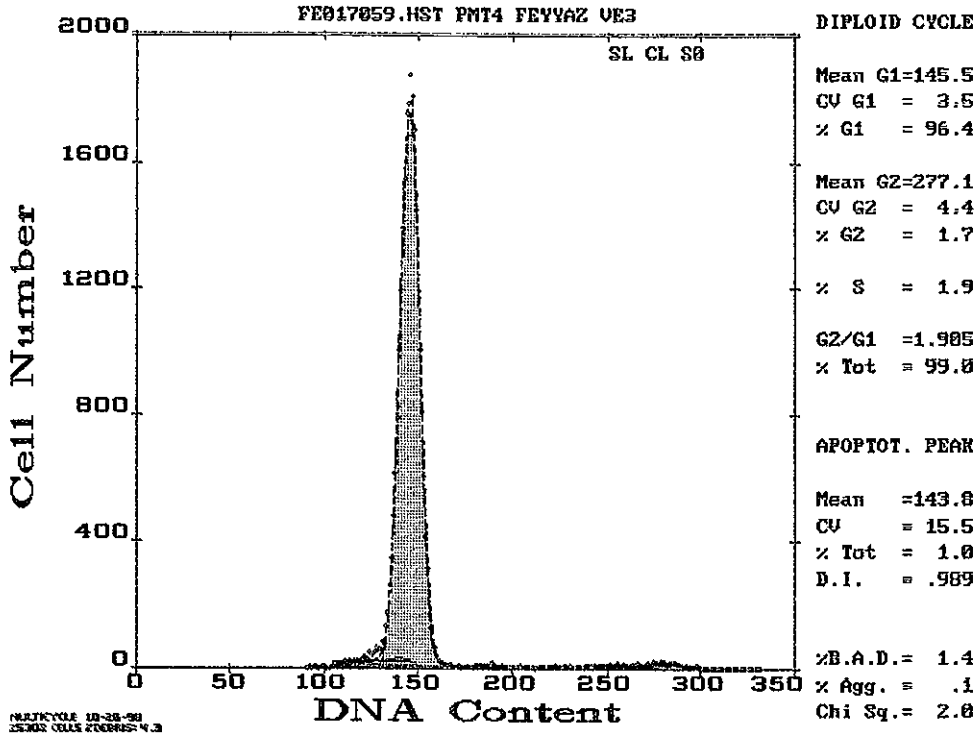
	PI % (S + G2/M)
KONTROL	18.04±7.11
ATRA	16.37±6.01
VD3	17.07±6.16
DEX1	15.91±7.80
DEX2	12.27±3.54
DEX3	14.15±7.81
A-VD3	19.52±6.69
A-DEX	13.15±8.46
DEX-VD3	16.87±8.97
A-VD3-DEX	11.38±6.50



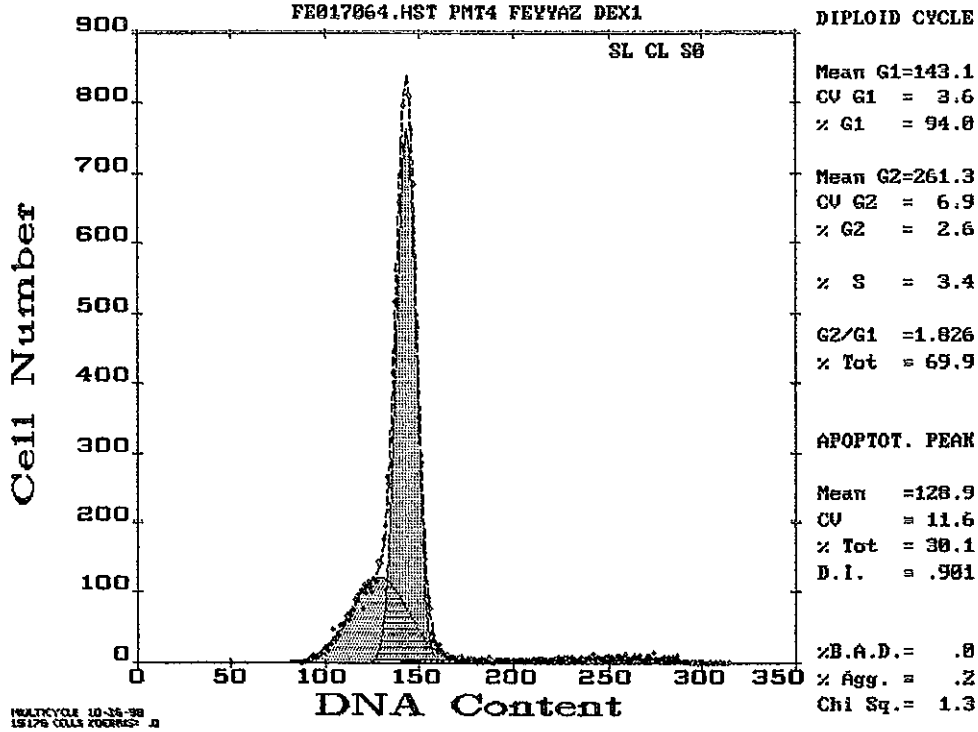
Şekil 5 : Flow cytometri : Kontrol grubu



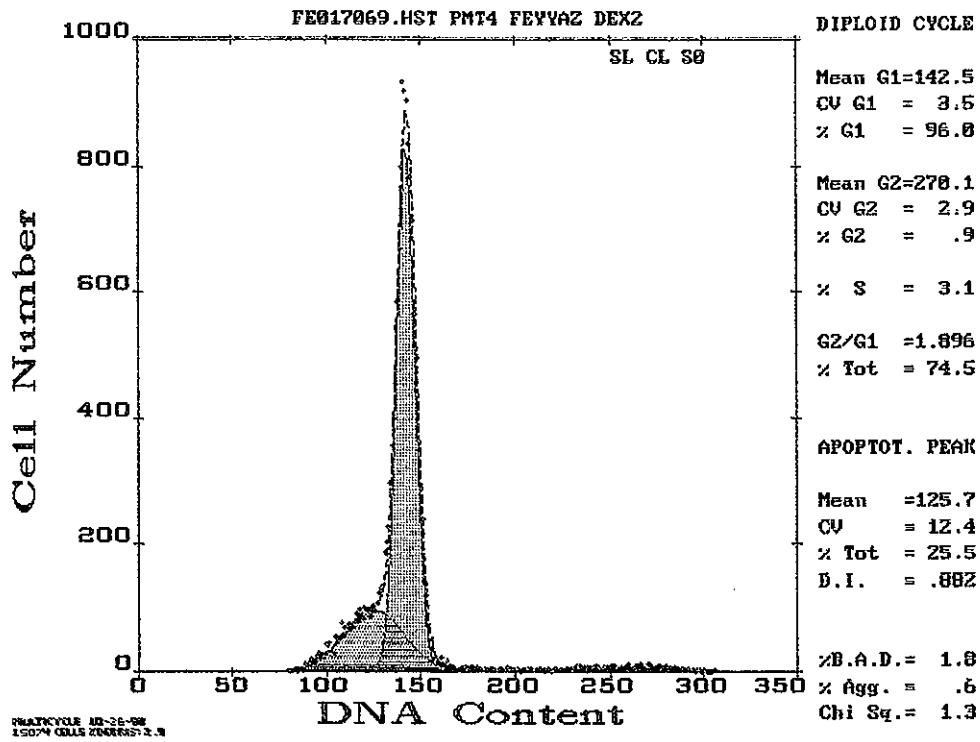
Şekil 6 : Flow cytometri : ATRA grubu



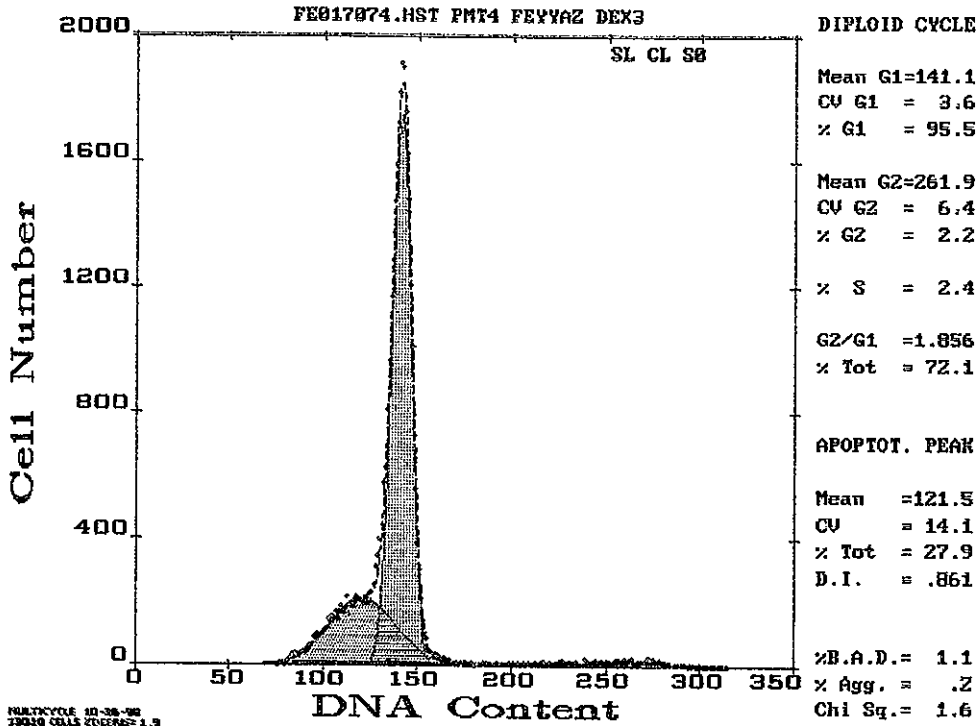
Şekil 7 : Flow cytometri : VD3 grubu



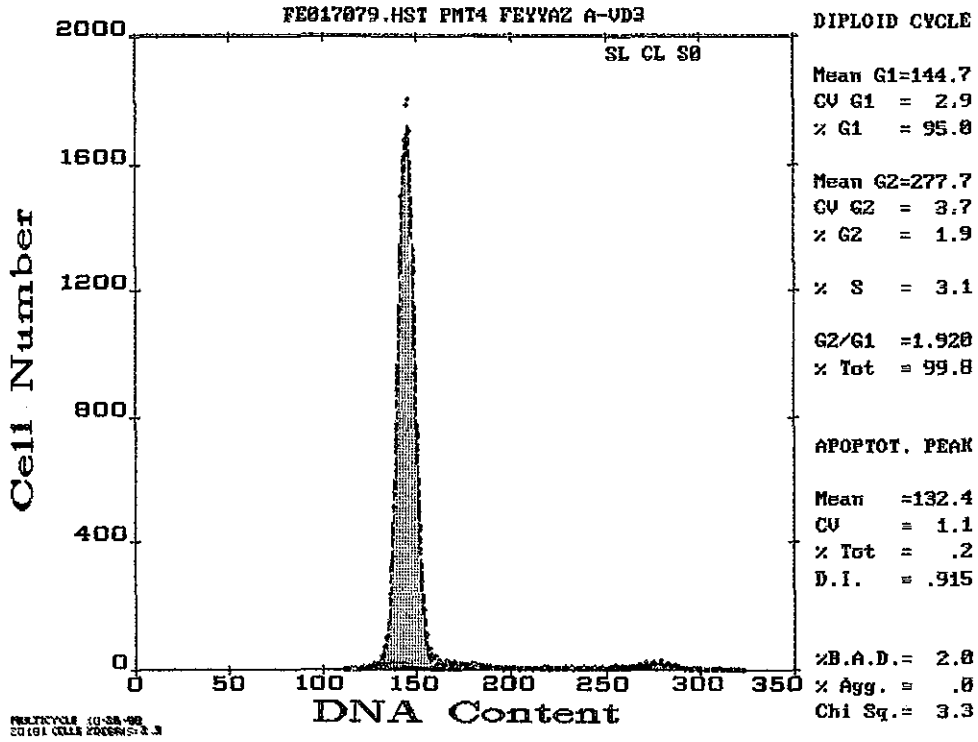
Şekil 8 : Flow cytometri : DEX1 grubu



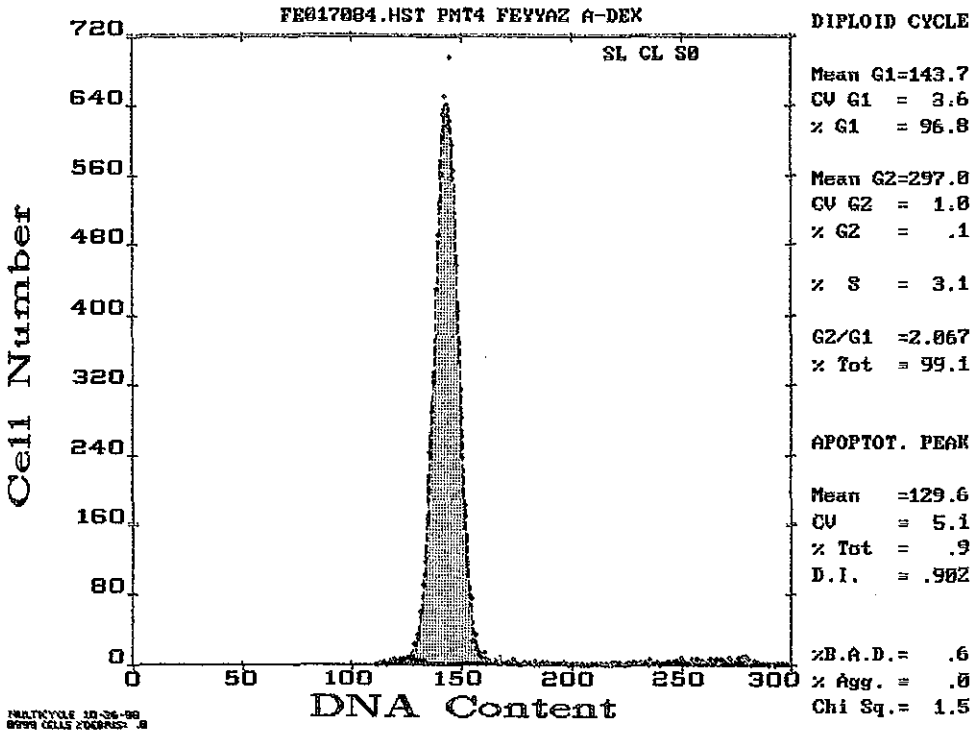
Şekil 9 : Flow cytometri : DEX2 grubu



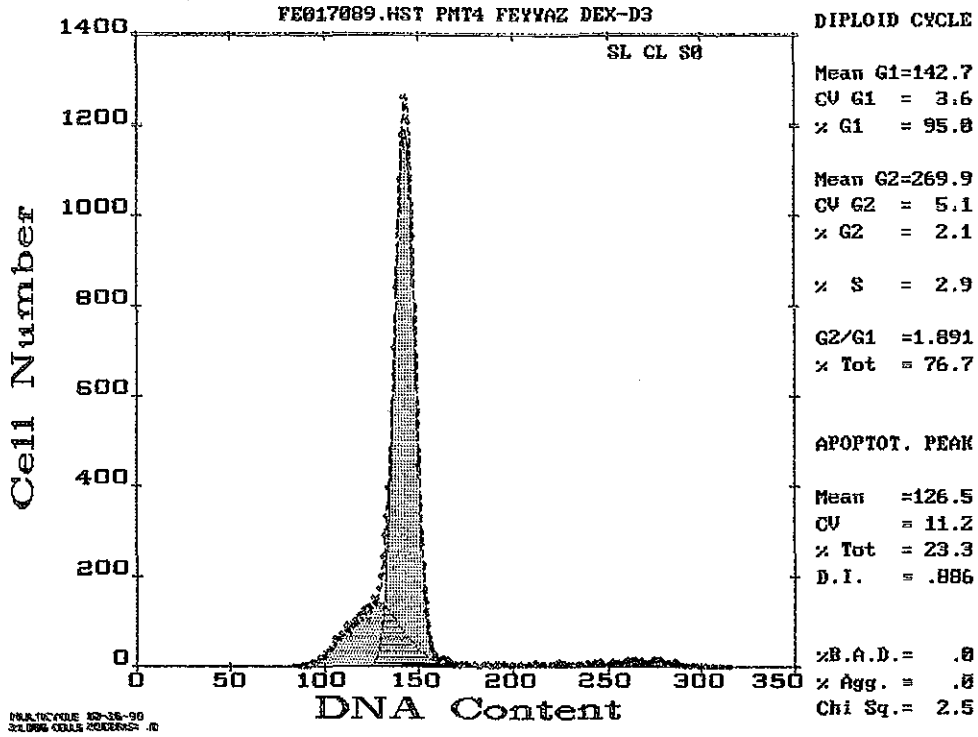
Şekil 10 : Flow cytometri : DEX3 grubu



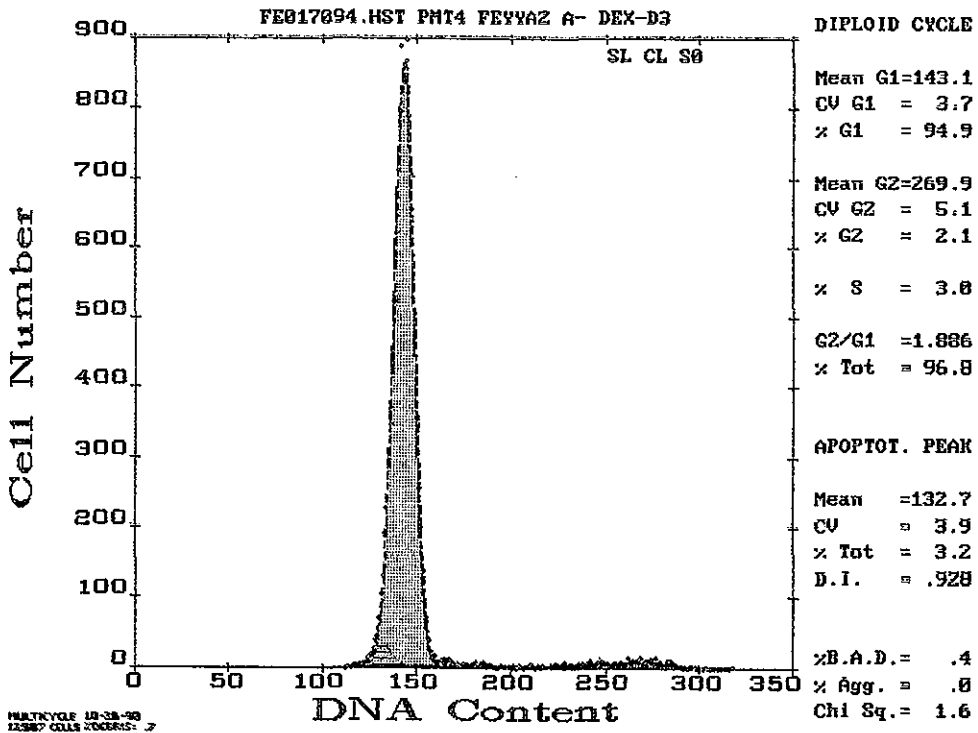
Şekil 11 : Flow cytometri : A-VD3 grubu



Şekil 12 : Flow cytometri : A-DEX grubu



Şekil 13 : Flow cytometri : DEX-VD3 grubu

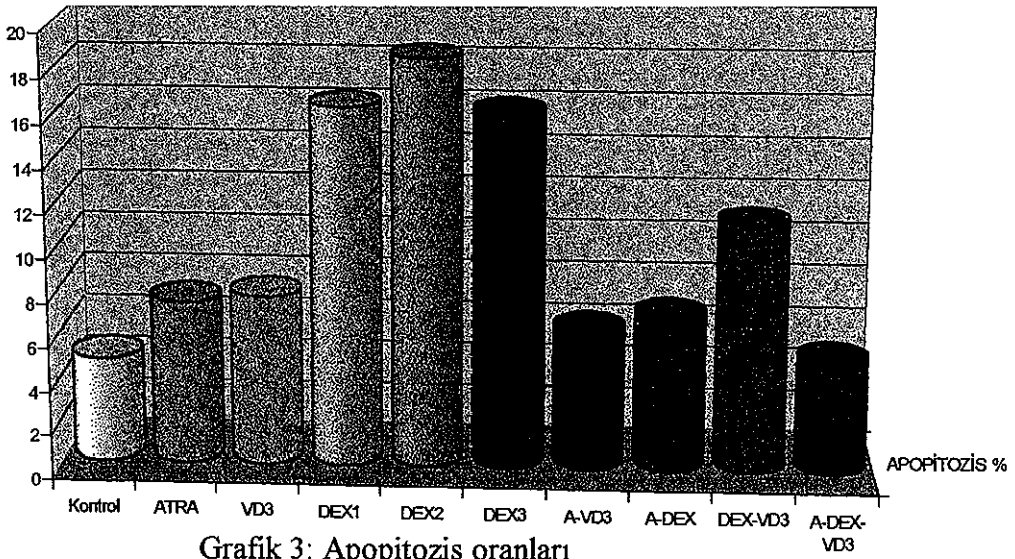


Şekil 14 : Flow cytometri : A-DEX-VD3 grubu

4.3. Apoptozisin Değerlendirilmesi

Grafik 3 ve tablo 7’te gösterildiği gibi inkübasyon sonrası tüm gruplardaki hücrelerin apoptozis yüzdeleri kontrol grubuyla karşılaştırılmış ve aşağıdaki gibi anlamlı farklar bulunmuştur ($p < 0.05$).

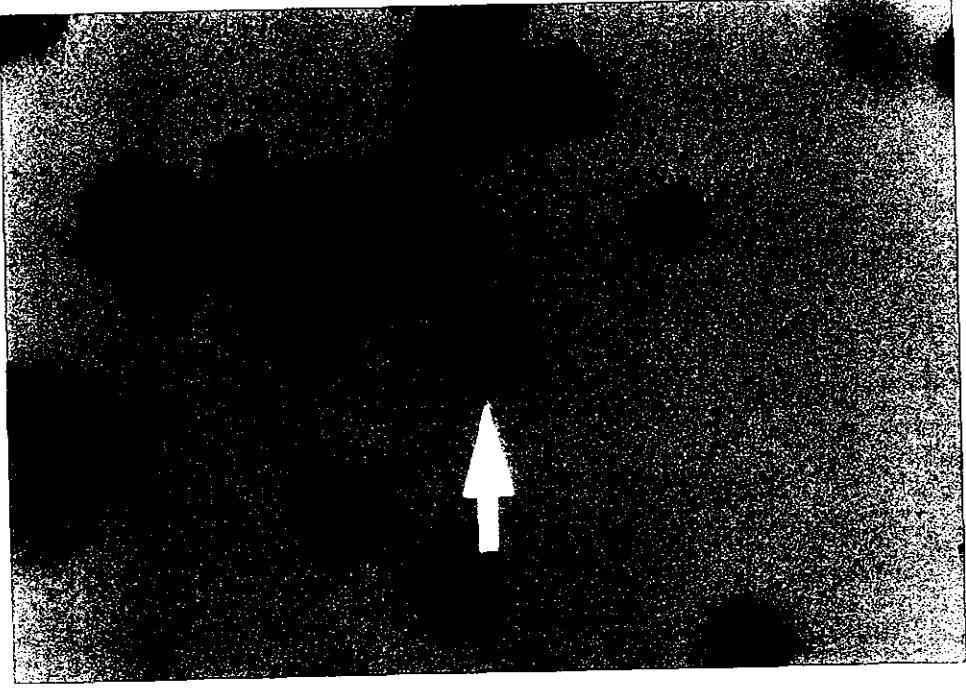
KONTROL = ATRA = VD3 = A-VD3 = A- DEX = DEX-VD3 = A-DEX-VD3
< DEX1 = DEX2 = DEX3 (p<0,05)



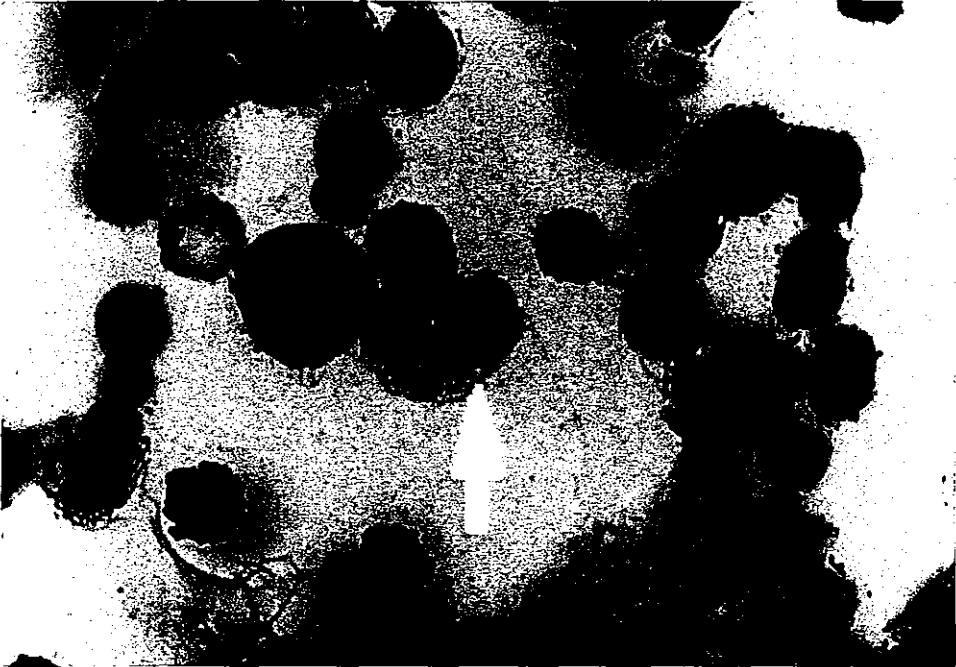
Grafik 3: Apoptozis oranları

Tablo 7: Apoptozis oranları

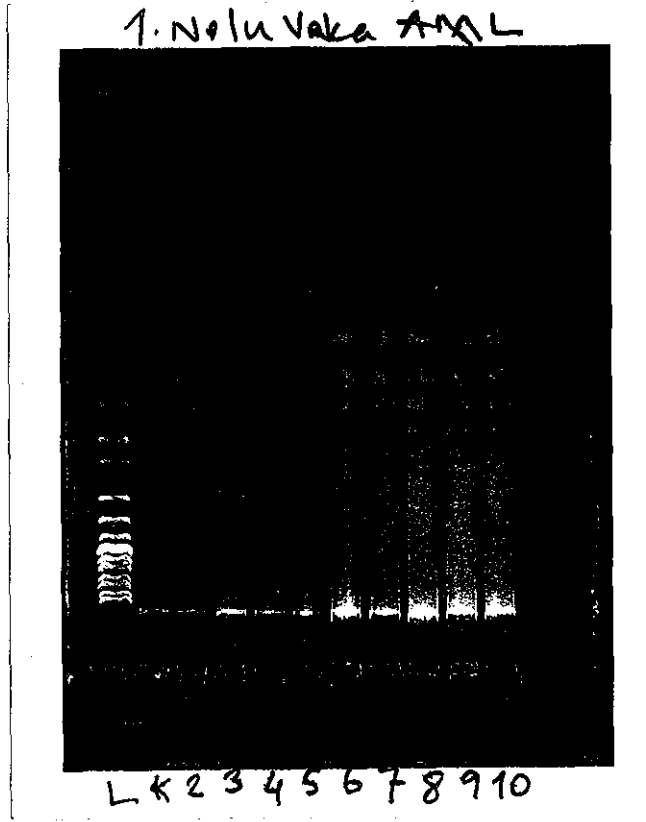
	APO %
KONTROL	4.81±4.18
ATRA	7.45±7.12
VD3	7.75±5.82
DEX1	16.42±7.16
DEX2	18.62±10.32
DEX3	16.24±7.66
A-VD3	6.38±7.89
A-DEX	7.07±5.17
DEX-VD3	11.32±5.65
A-VD3-DEX	5.14±4.00



Resim 5 : Apoptozis gösteren hücreler



Resim 6 : Apoptozis gösteren hücreler



Resim 7 : Apoptozisin elektroforez ile gösterilmesi: Elektroforetik olarak tüm ilaç gruplarında apoptozise ait merdiven smear izlenmektedir.

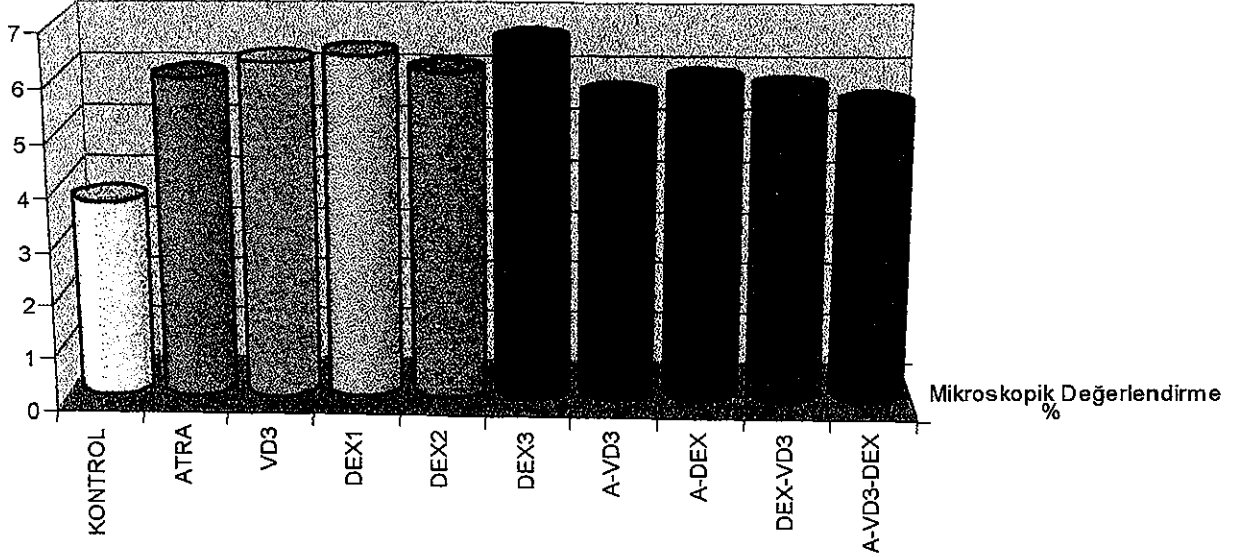
4.4. Diferansiasyon Değerlendirmeleri

İlaç gruplarının hücreler üzerindeki diferansiye edici etkinliği aşağıdaki değerlendirme yöntemleri kullanılarak tespit edildi.

4.4.1. Mikroskopik Değerlendirme

Grafik 5 ve tablo 8'de görüldüğü gibi 3 günlük inkübasyon sonrası tüm gruptaki diferansiye olan hücre yüzdeleri kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve aşağıdaki gibi anlamlı farklar bulunmuştur ($p < 0.05$).

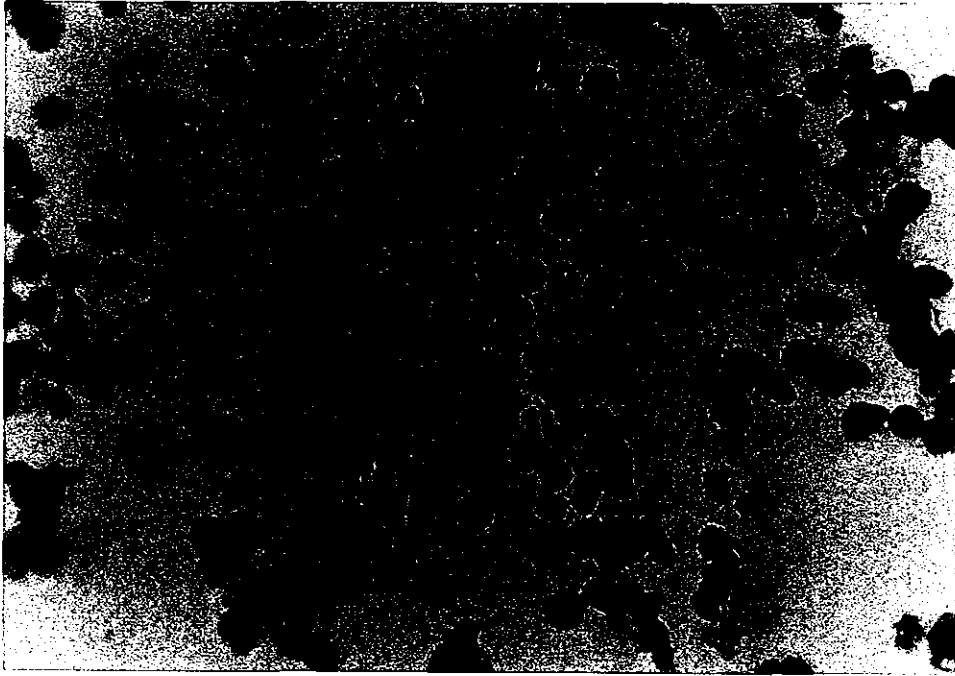
KONTROL < ATRA = VD3 = DEX1 = DEX2 = DEX3 = A-VD3 = A-DEX = DEX-VD3 = A-DEX-VD3 (p<0,05)



Grafik 4 : Diferansiyasyon oranları

Tablo 8: Diferansiyasyon gösteren hücre yüzdeleri

	DİFERANSİYASYON %
KONTROL	3.71±2.03
ATRA	6.00±2.91
VD3	6.28±2.75
DEX1	6.42±1.46
DEX2	6.14±2.14
DEX3	6.71±0.68
A-VD3	5.71±1.88
A-DEX	6.00±2.52
DEX-VD3	5.85±1.89
A-VD3-DEX	5.57±1.91

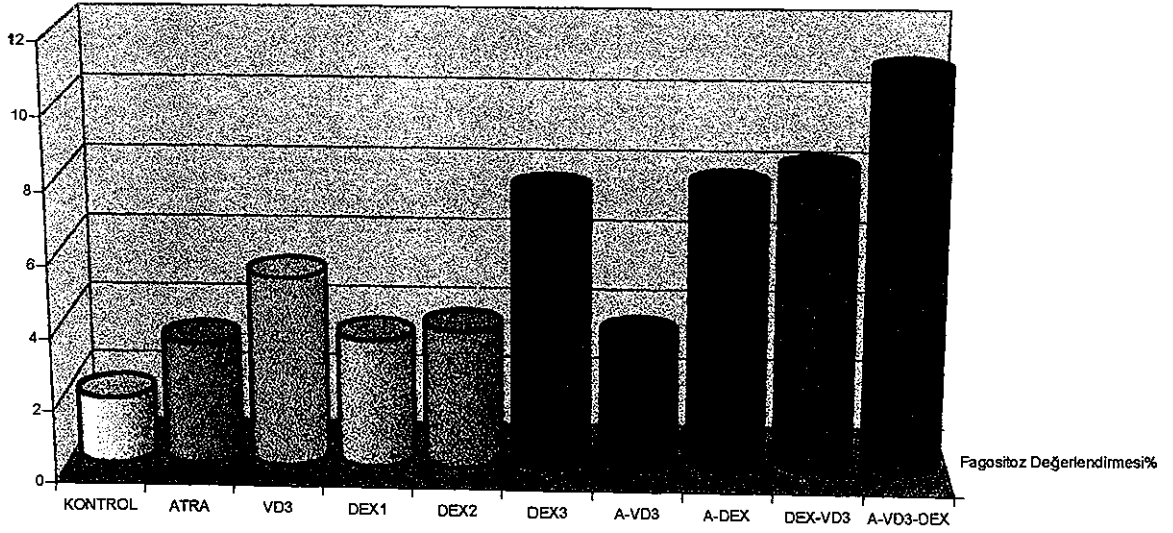


Resim 8 : Diferansiasyon gösteren hücreler

4.4.2. Fagositoz Değerlendirmesi

Grafik 6 ve tablo 9'de gösterildiği gibi inkübasyon sonrası tüm gruplardaki Fagositoz yapan hücrelerin yüzdeleri kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve aşağıdaki gibi anlamlı farklar bulunmuştur ($p < 0.05$).

KONTROL < ATRA = DEX1 = DEX2 = A-VD3 < VD3 = DEX3 = A-DEX = DEX-VD3 < A-DEX-VD3
(p<0.05)



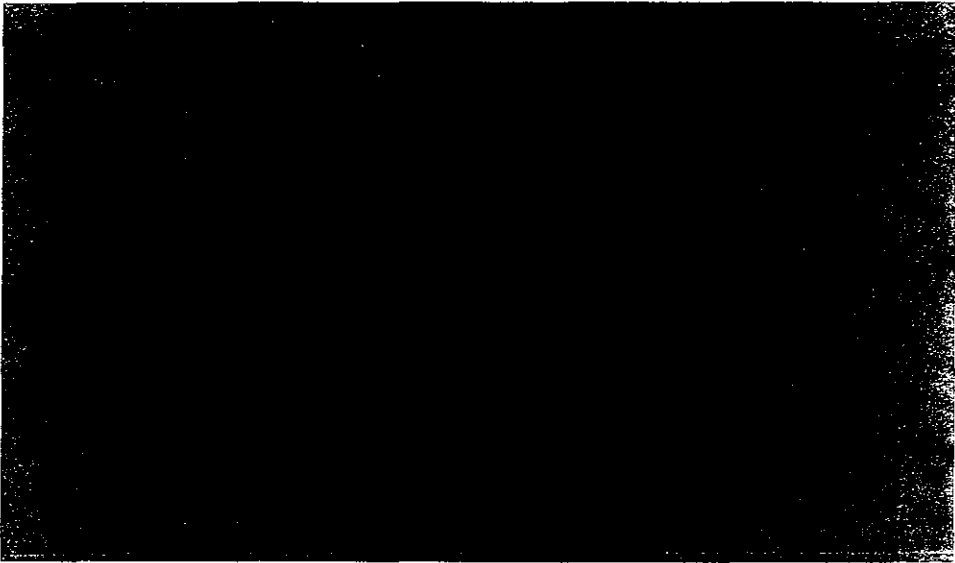
Grafik 5: Fagositoz gösteren hücre yüzdeleri

Tablo 9: Gruplardaki hücrelerin fagositoz yüzdeleri

	FAGOSİTOZ YÜZDESİ
KONTROL	1.86±0
ATRA	3.43±0
VD3	5.29±0
DEX1	3.57±0
DEX2	3.86±0.88
DEX3	7.71±2.0
A-VD3	3.71±0
A-DEX	7.86±2.0
DEX-VD3	8.29±2.0
A-DEX-VD3	11.00±3.0



Resim 9 : Fagositoz yapan bir hücre

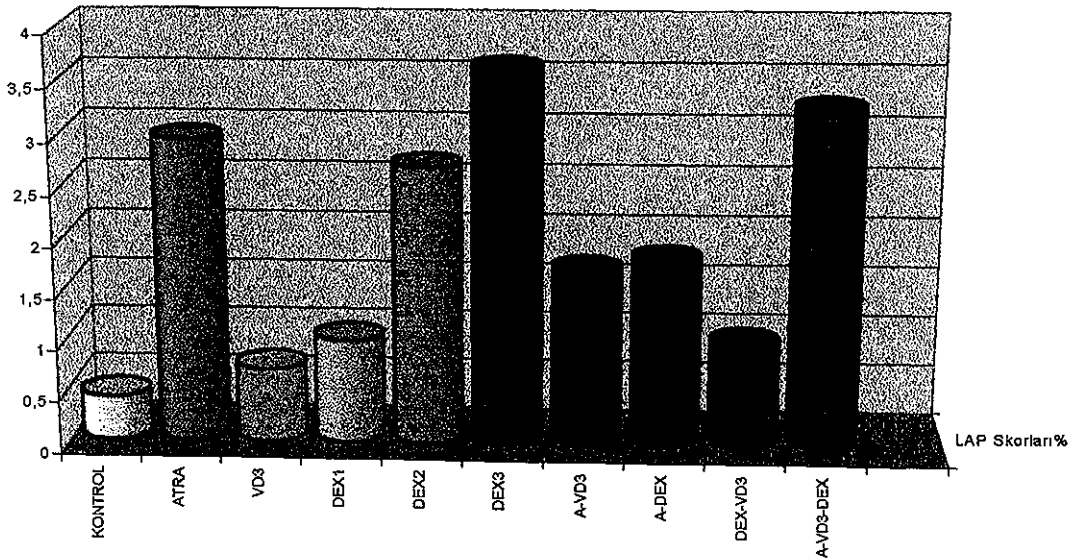


Resim 10 : Fagositoz yapan diğeri bir hücre

4.4.3. LAP Skoruması

Grafik 7 ve tablo 10'da gösterildiği gibi inkübasyon sonrası tüm gruptaki LAP skoru kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve aşağıda gösterildiği gibi aralarında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

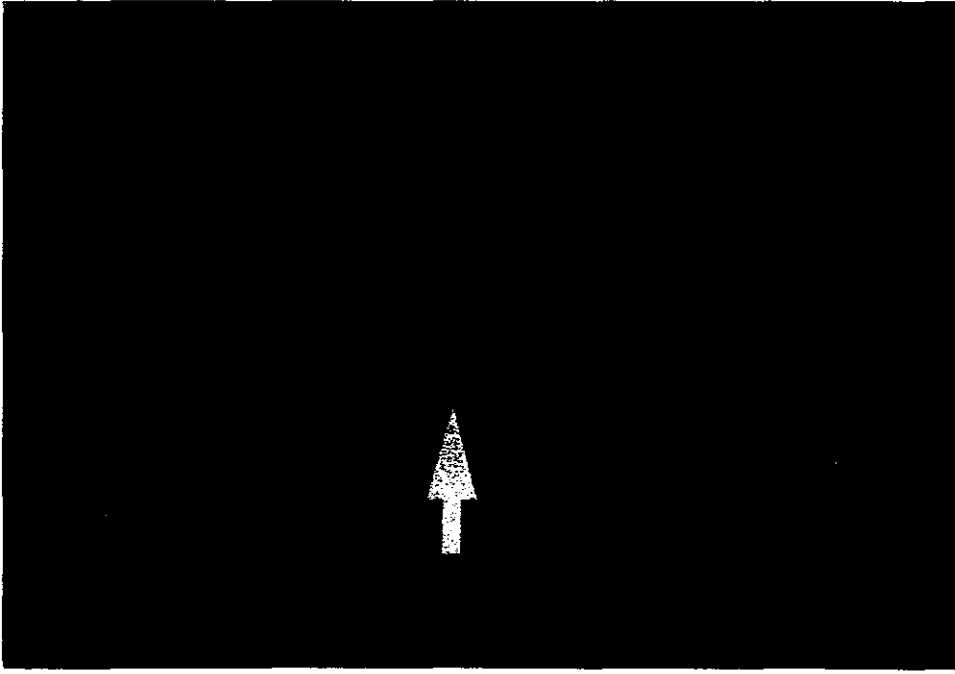
KONTROL = VD3 = DEX1 = DEX-VD3 < A-VD3 = A-DEX < ATRA = DEX2 = DE3 = A-DEX-VD3 ($p < 0.05$)



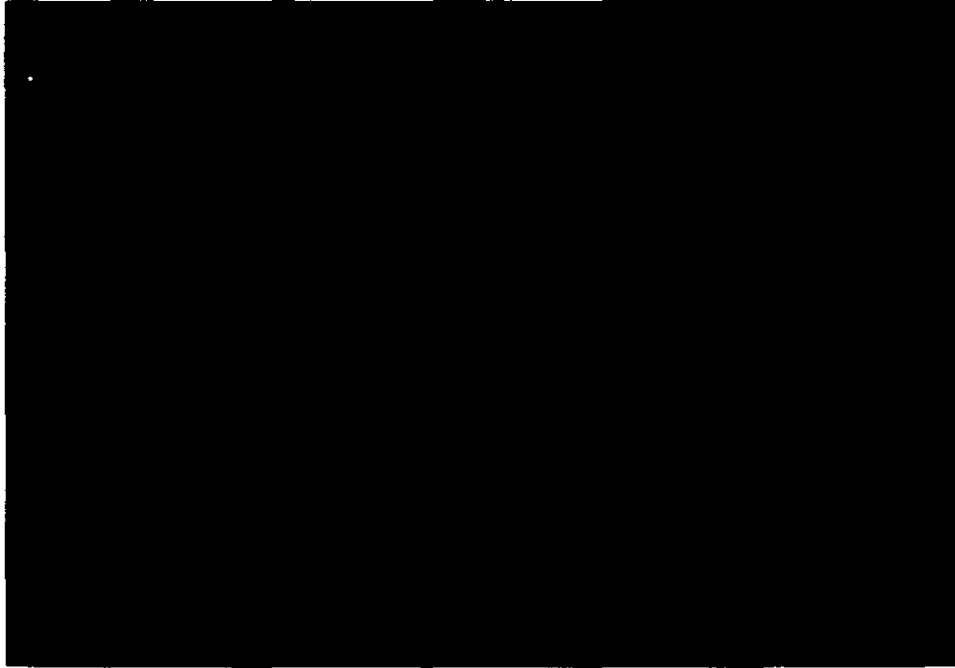
Grafik 6: Gruptaki hücrelerin LAP Skoruması

Tablo 10 : Gruptaki hücrelerin LAP skoruması

	LAP SKORU %
Kontrol	0,42±0,42
ATRA	2,96±2,84
VD3	0,71±0,56
DEX1	1±0,58
DEX2	2,71±2,23
DEX3	3,64±1,25
A-VD3	1,71±1,08
A-DEX	1,82±1,69
DEX-VD3	1,57±0,78
A-DEX-VD3	3,28±1,40



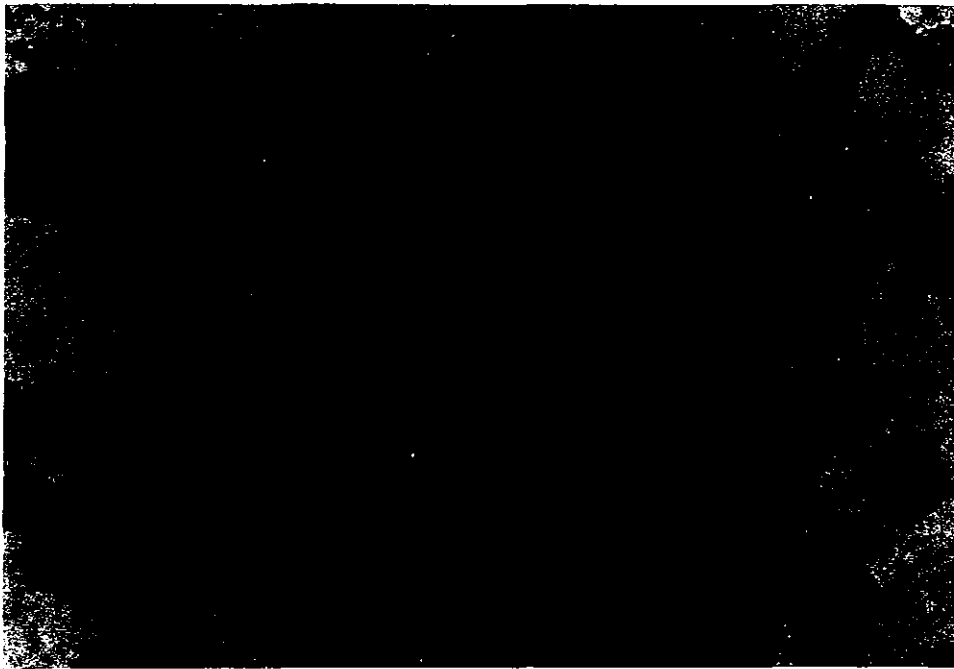
Resim 11 : LAP skoru 1 (+) hücre



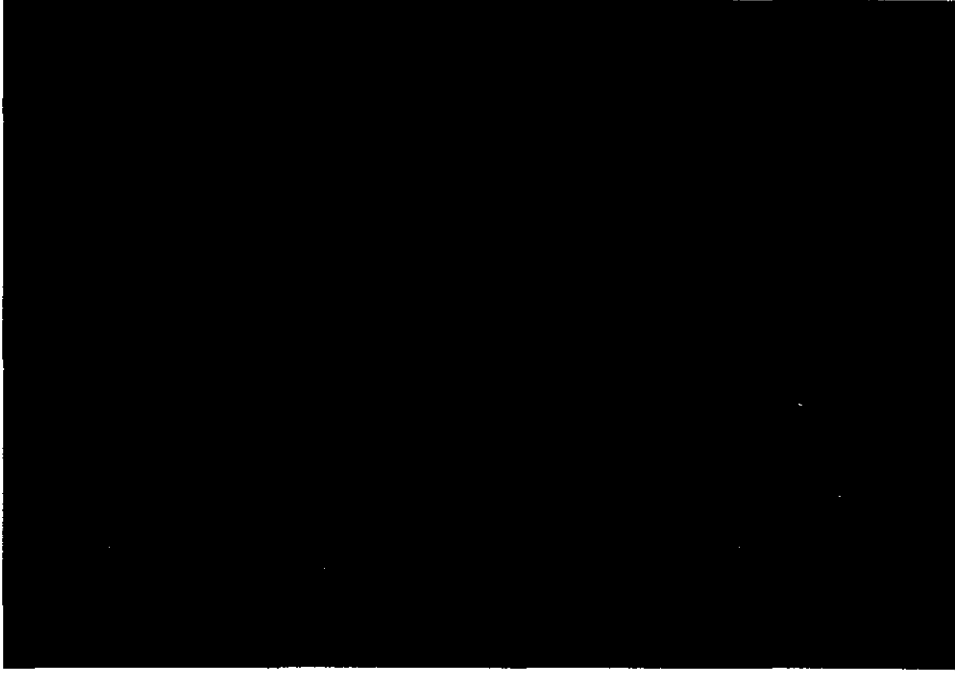
Resim 12 : LAP skoru 1 (+) hücre



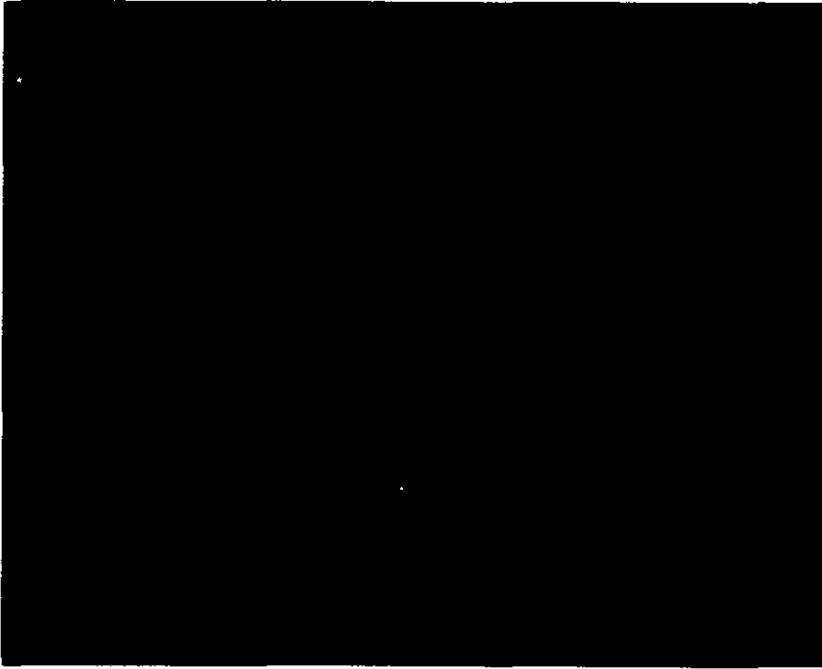
Resim 13 : LAP skoru 2 (+) hücre



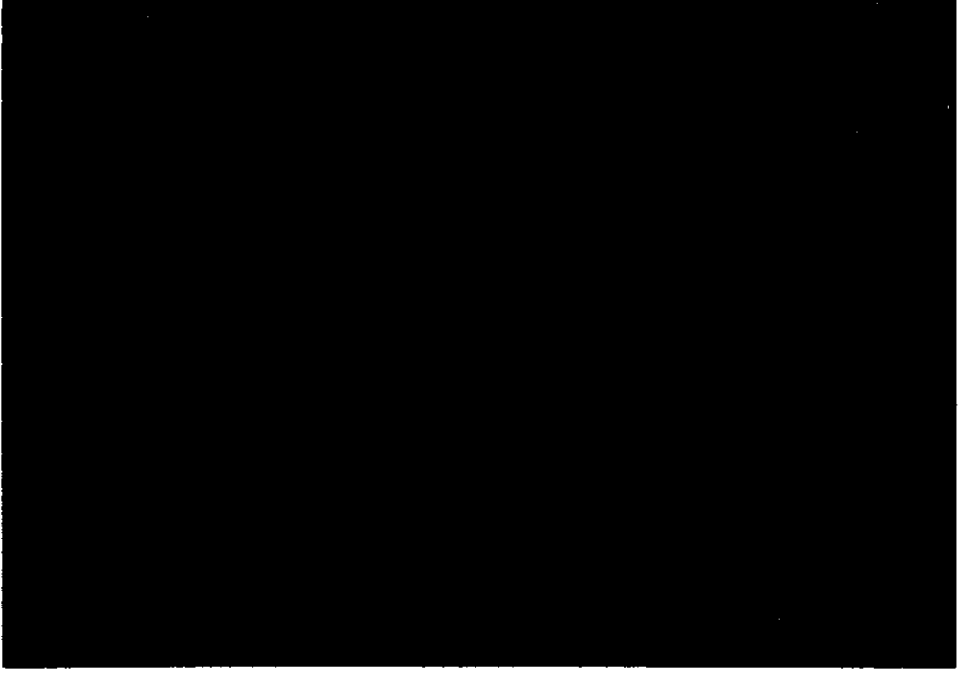
Resim 14 : LAP skoru 2 (+) hücre



Resim 15 : LAP skoru 3 (+) hücre



Resim 16 : LAP skoru 3 (+) hücre



Resim 17 : LAP skoru 4 (+) hücre



Resim 18 : LAP skoru 4 (+) hücre

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, ATRA, deksametazon, vitamin D3 ve kombinasyonlarının akut promyelositik lösemi (AML M3) dışındaki AML olgularında tümör gelişimi ve diferansiasyonu üzerindeki etkilerini hücre kültür ortamında araştırdık.

ATRA, lösemik hücreler dışında çeşitli malign hücreler üzerinde proliferasyonu inhibe edici, apoptozisi uyarıcı özelliklere sahiptir (74-79). AML M3 dışındaki myeloblastik lösemi hücreler için etkileri tartışmalı olan ATRA, AML M3 olgularındaki promyelositik lösemik hücreler üzerindeki diferansiasyonu ve apoptozisi uyarıcı, proliferasyonu inhibe edici etkilerinden dolayı tedavide başarıyla kullanılmaktadır (1,5,7). ATRA'nın AML M3 dışındaki myeloblastik lösemi hücrelerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada Pallis ve arkadaşları 12 hastadan elde ettikleri lösemik hücreleri kullanmışlardır. Çalışma sonucunda ATRA'nın hücre proliferasyonunu kontrol grubuna göre %83 oranında inhibe ettiği, diferansiasyon, apoptozisi uyardığı görülmüştür (31). Başka bir çalışmada da ATRA'nın HL60 (myeloid lösemik cell-line) hücreleri üzerinde diferansiasyonu artan dozlarıyla daha anlamlı şekilde uyurabildiği bildirilmiştir (80). Mevcut bu literatür bilgileri ışığında ATRA'nın AML M3 dışı myeloblastik lösemik hücreler üzerine diferansiye edici etkisi tekrarlanan çalışmalarla gösterilmişken, proliferasyon ve apoptozise etkilerini araştıran yeterli sayı ve genişlikte çalışma olmadığı görülmektedir.

Bizim çalışmamızda, ATRA'nın hücre sayısı, apoptozis ve proliferasyon üzerine anlamlı etkisi tespit edilemedi. Buna karşın ATRA'nın AML M3 dışındaki myeloblastik lösemik hücreler üzerine diferansiye edici etkisi gösterildi. Bu sonuç literatürde mevcut ATRA'nın söz konusu hücreler üzerine diferansiye edici özelliğini gösteren çalışmalar ile uyumlu idi (31). AML M3 dışındaki lösemik hücreler üzerinde proliferasyonu inhibe edici, apoptozisi uyarıcı etkileri bildirilmiş tek çalışma mevcuttur (31). Literatürde aynı hücre grubunda yapılmış ikinci çalışma olan bizim çalışmamızda ATRA'nın yukarıda bahsedilen proliferasyonu inhibe

edici ve apoptozisi uyarıcı etkileri tespit edilememiştir. Ancak daha önce yapılmış sözü edilen çalışmada (31) kullanılan ATRA dozu bizim çalışmamızda kullanılan dozun 2 katı olup, önceki çalışmada elde edilen proliferasyon inhibisyonu ve apoptozis uyarısı sonuçlarının doza bağımlı olduğu düşünüldü.

Literatürde vitamin D3'ün lösemik hücreler dışında, çeşitli kanser dizilerinde diferansiasyonu uyardığı bildirilmektedir (43). Akut myeloblastik lösemi hücre dizileri (HL60) üzerinde vitamin D3'ün diferansiasyon etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, vitamin D3'ün diferansiasyonu uyardığı gösterilmiştir. Vitamin D3'ün bu etkisi, HL 60 lösemi hücrelerindeki aldoketoredüktaz enzim aktivitesini inhibe etmesiyle açıklanmaya çalışılmıştır (29,44). Bunun aksine diğer bir çalışmada vitamin D3'ün AML hücre dizilerinde diferansiye edici etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (44). Çalışmamızda ise vitamin D3, AML M3 dışındaki myeloblastik lösemik hücre kültüründe, kontrol grubuna oranla, hafif derecede istatistiksel olarak anlamlı diferansiasyonu uyarıcı etkide bulundu. Elde ettiğimiz bu sonuç, tekrarlanmış ve daha geniş kapsamlı olan daha önceki çalışmalarla (29,43,44) uyumlu olarak değerlendirildi.

Literatürde vitamin D3'ün malign hücreler üzerine olan en belirgin etkisinin proliferasyonun inhibisyonu yönünde olduğu görülmektedir (43-45). Vitamin D3 ile oluşabilen en önemli yan etkinin hiperkalsemi olduğundan yola çıkarak geliştirilmiş yeni jenerasyon vitamin D3 analoglarının kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır (41,45,81,82). Örneğin EB 1089 vitamin D3 analogunun düşük hiperkalsemik etkisine karşın belirgin antiproliferatif etkide bulunduğu gösterilmiştir (81). Yine başka bir çalışmada vitamin D3'ün 11 analogu kullanılmış ve bunlardan 9'unun düşük dozlarda bile (10^{-8} - 10^{-11} Mol/L) HL60 hücre serilerinde proliferasyonu belirgin inhibe edici özelliği gösterilmiştir (41). Bu çalışmada vitamin D3'ün AML M3 dışındaki myeloblastik hücre kültüründe, proliferasyonu inhibe edici etkinlikte bulunmadığı görüldü. Çalışmamızda vitamin D3'ün literatürün aksine antiproliferatif özellik göstermemesinin nedeni olarak, kullandığımız vitamin D3 analogunun farklı olmasının yanısıra kombine maddeler içermesinden kaynaklanabileceği düşünüldü.

Literatürde, vitamin D3 analoglarının lösemi dışındaki çeşitli lösemik kanser hücre dizilerinde apoptozisi uyarıcı etkinliğini gösteren çalışmalar mevcuttur (45,84). Buna karşın myeloblastik lösemi hücrelerinde apoptozisi uyarıcı etkisini araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız bu araştırmada ise vitamin D3'ün myeloblastlarda apoptozisi indüklediği gözlenmiştir. Diğer taraftan vitamin D3'ün, hastalarımıza ait myeloblast hücre

kültüründe hücre sayılarını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalttığı saptanmıştır. Vitamin D3'ün antiproliferatif ve apoptotik etki göstermeksizin hücre sayısını azaltmasının muhtemel nedeni hücre diferansiasyonunu indüklemesi nedeni ile oluşabilecek olan hücre siklus sürecinin uzaması-yavaşlaması olduğu kanaatindeyiz.

GK'lerin AML hücreleri üzerinde diferansiasyon etkisini araştıran iki çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar sonucunda GK'lerin AML hücrelerinin diferansiasyonunu artırdığı gösterilmiştir (4,62). Çalışmamız sonucunda deksametazon AML M3 dışındaki myeloblastik hücre kültüründe kontrol grubuna oranla diferansiasyonu anlamlı ölçüde uyardığı izlendi. Bu bulgu literatür ile uyumlu olarak değerlendirildi.

Daha önceki çalışmalarda deksametazonun çeşitli malign hücrelerde proliferasyon üzerine etkisi araştırılmış ve deksametazonun proliferasyonu inhibe ettiği yönünde bulgular elde edilmiştir (77,83). Bu yönde, myeloblastik lösemik hücreler üzerinde deksametazonun proliferasyona etkisini araştıran tek çalışma mevcut olup daha önce sözü edilen proliferasyonu inhibe edici özelliği bu malign hücre tipinde de gösterilmiştir (4). Bizim çalışmamızda deksametazon-1 grubu için, AML M3 dışındaki AML hücrelerinde, kontrol grubuna oranla proliferasyon açısından anlamlı fark elde edilmedi. Daha sonra belirtilecek olan deksametazon-2 ve 3 gruplarında kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde proliferasyon inhibisyonun sağlanması, deksametazonun artan dozlarda bu yönde etkinlik gösterdiğini düşündürmektedir.

Daha önce yapılmış çalışmalarda, glukokortikoid (GK) lerin DNA ve kromatin yapısında fragmentasyon, hücre yapısında bozulma ve stoplazmik proteinlerde değişim sonucunda hücre ölümüne (apoptozis) neden olduğu gösterilmiştir. Benzer olarak, GK'lerin apoptotik aktiviteyi uyaran protoonkogenlerin etkilerini düzenleyerek de apoptozisi uyurabildiği bildirilmiştir (51-53). Hematolojik malign hastalıklarda başlıca apoptozisi uyarıcı etkisinden yararlanan bu ilaçlar hücre dizilerindeki malign hücre sayısını azaltabilmektedir (51-53). GK'lerin bazı lenfoid lösemi hücrelerinde ve AML'nin bazı tiplerinde apoptozisi uyurabildiği gösterilmiştir (4). Çalışmamızda, hücre kültür ortamına 50 nMol deksametazon eklenerek deksametazon-1, 100nMol ile deksametazon-2, 150 nMol ile deksametazon-3 grubu oluşturulmuştur. Bizim çalışmamızda AML M3 dışındaki myeloblastik lösemi hücrelerinde deksametazon-1 grubunun apoptozisi uyarması, kontrol grubuna oranla anlamlı olarak yüksek olup literatür bilgisiyle uyumluydu (4).

Literatürde deksametazonun myeloid lösemik hücre gruplarında hücre sayısı üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışma yoktur. Bizim çalışmamızda deksametazon-1

grubunda, AML M3 dışındaki myeloblastik lösemi hücre sayısı üzerinde anlamlı azaltıcı etkisi tespit edildi. Deksametazon-1 grubunda proliferasyonun inhibe olmamasına rağmen hücre sayısındaki azalmanın apoptozis ve diferansiasyonun deksametazon tarafından uyarılmasının yanında deksametazonun hücre siklus süresini uzatıcı etkisinin katkıda bulunabileceği düşünülmüştür (84).

Çalışmamız sonucunda deksametazon-2 grubunda, deksametazon-1 grubuna oranla hücre sayısının azalması, apoptozis ve diferansiasyonun uyarılması, kontrol grubu da gözönüne alındığında çok daha anlamlı ölçüde etkili bulunmuştur. Bununla birlikte yine deksametazon-2 grubunda, deksametazon-1 grubunda bulunmayan bir özellik olarak AML M3 dışındaki myeloid lösemi hücre proliferasyonu inhibe edilmiştir. Literatürde deksametazonun artan dozlarının AML hücreleri üzerindeki etkisini araştıran çalışma yoktur.

Deksametazon-3 ilaç grubu, deksametazon-1 grubuna göre, kontrol grubu da gözönüne alındığında, daha anlamlı ölçüde apoptozis ve diferansiasyonu uyarılmaktadır. Yine bu grupta, proliferasyon inhibisyonu ve buna bağlı olarak geliştiği düşünülen hücre sayısında belirgin azalma gözlenmiştir. Deksametazon-3 grubunda, deksametazon-1 grubunda olmayıp, deksametazon-2 grubunda gözlenen proliferasyon inhibisyonu gerçekleşmiştir. Deksametazon-3 grubunun, deksametazon-2 grubundan farklı olan tek sonucu; diferansiasyonun değerlendirilmesinde kullanılan fagositoz testinde daha anlamlı diferansiye edici özellik göstermesidir.

Deksametazon ilaç gruplarının çalışma sonuçlarına toplu olarak bakıldığında, artan deksametazon dozları ile artan ölçülerde lösemik hücre diferansiasyonu ve apoptozisini uyarmakta olduğu ve hücre çoğalmasını kontrol edebileceği görülmüştür. Deksametazonun AML hücre dizilerine olan bu etkileri klinik uygulamalar için uygun ve ümit verici görünmektedir.

Literatürde ATRA ve deksametazon kombine kullanımının AML hücreleri üzerine etkilerini araştıran tek çalışma mevcuttur (85). Bu çalışmada, HL60 cell-line hücreleri üzerine deksametazon ve ATRA tek tek ve birlikte kullanılmış, çalışmanın sonucunda ATRA'nın HL60 hücrelerinin diferansiasyonunu indüklediği gözlenmiştir. Deksametazon grubunda ise bu etki elde edilememiştir. HL60 hücrelerinin ATRA ile uyarılmasından sonra deksametazon uygulanmasında, ATRA'nın tek başına uygulanmasından elde edilen diferansiasyonun arttığı ve buna proliferasyonun ihhibisyonu etkisinin eklendiği gözlenmiştir (85).

Çalışmamızda ise ATRA ve deksametazonun birlikte uygulanması sonucunda, AML M3 dışındaki myeloid lösemi hücrelerinde kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde

diferansiasyonun uyarıldığı, proliferasyonun inhibe edildiği ve hücre sayısında azalma olduğu gözlenmiştir. Hücre sayısındaki azalmanın artan diferansiasyon ve inhibe olan proliferasyonun sonucu olduğu düşünülmüştür. Bu kombine ilaç grubunda, kontrol grubundan farklı apoptozis değeri elde edilememiştir. Apoptozis açısından deksametazon-1 grubunda elde edilen apoptozisin uyarılması sonucunun, ATRA ile kombinasyondan sonra ortadan kalkması, bizi ATRA'nın deksametazona bağlı lösemik hücre apoptozisini engellediği sonucuna düşündürmektedir. Ancak apoptozis dışında tüm fonksiyonlarda ATRA ve deksametazon-1'in aditif bir etki gösterdiği saptanmıştır.

ATRA ve vitamin D3'ün birlikte AML hücreleri üzerine olan etkilerini içeren daha önce yapılmış çalışmalara baktığımızda; Camagna ve arkadaşlarının bu iki ilaç kombinasyonunun, AML hücre dizilerinde aditif olarak diferansiasyonu uyarabildiği sonucuyla karşılaşmaktayız (86). Elstner ve arkadaşları da, bir vitamin D3 analogu olan KH 1060 ve ATRA kombinasyonunu HL60 hücreleri üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmanın sonucu olarak HL60 hücrelerinde proliferasyonun inhibe olduğu, apoptozis ve diferansiasyonun uyarıldığı ve bu etkilerin yine aditif özellik taşıdığı bildirilmiştir (87). Vitamin D3 ve ATRA'nın kombine kullanıldığı başka bir çalışma, NB4 (akut promyelositik lösemi) hücreleri ile gerçekleştirilmiş ve sonuçta bu hücrelerin diferansiasyonunun uyarıldığı ve proliferasyonun inhibe edildiği gözlenmiştir (88).

Bizim çalışmamızda, AML M3 dışındaki myeloid lösemi hücrelerinde, ATRA-vitamin D3 kombinasyonunun birlikte kullanımı ile kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde diferansiasyonun uyarıldığı ve lösemik hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir. Ancak bu ilaç kombinasyonunun uygulanmasıyla apoptozis ve proliferasyonda, kontrol grubuna oranla anlamlı fark elde edilemedi ve bu iki ilacın bereber kullanılmasını aditif bir etki oluşturmadığı saptanmıştır. Daha önce yapılmış çalışmaların cell-line özelliği göz önüne alındığında, bizim çalışmamızda kullanılan hücrelerin hastalardan elde edilmiş AML hücreleri olması nedeniyle farklı sonuçlandığını düşünmekteyiz.

Literatürde, AML hücreleri üzerinde deksametazon ve vitamin D3'ün birlikte kullanıldığı bir çalışma yoktur. Ancak bu ilaç kombinasyonunun kemik iliği stromal hücreleri ile yapılan çalışmada, hücrelerin diferansiasyonunu uyardığı gösterilmiştir (89).

Çalışmamızda deksametazon-vitamin D3 ilaç kombinasyonu, hücre diferansiasyonunu kontrol grubuna göre artan derecede uyarırken, apoptozis ve antiproliferatif etkinlik göstermeksizin orta derecede hücre sayısını azaltmıştır. Bu etkileri açısından bu iki ilacın hafif bir aditif özellik gösterdiği gözlemlendi. Deksametazonun tek başına kullanıldığı gruptaki anlamlı apoptozis sonucunun, vitamin D3 ile kombinasyonunda görülememesi,

deksametazonun ATRA ile kombinasyonunda olduğu gibi, vitamin D3'ünde deksametazonun apopitozis etkisini bloke ettiğini dűşündürmektedir. Deksametazon-vitamin D3 ilaç kombinasyonu ile elde edilen hücre sayısının azalması, diferansiasyonun uyarılmasının bir sonucu olarak değerlendirildi.

ATRA-deksametazon-vitamin D3'ün lösemik hücreler üzerinde kombine etkilerini araştıran bir çalışma yoktur. Bizim alışmamızda bu üçlü kombinasyon ile, AML M3 dışındaki AML hücrelerinde kuvvetli bir şekilde diferansiasyon ve apopitozisin uyarıldığı ve diğer tüm gruplara göre en anlamlı düzeyde antiproliferatif ve hücre sayısı azaltıcı etkileri bulunduğu gözlendi. Gruplar arası karşılaştırmada gözlenen bir diğer sonuç; ATRA-deksametazon grubunda elde edilen sonuçların apopitotik aktiviteyi etkilememek dışında, ATRA-deksametazon-vitamin D3 grubuna oldukça benzer olduğudur. Buradan hareketle ATRA-deksametazon ilaç kombinasyonuna yapılan vitamin D3 ilavesinin apopitozisi indűklediđi dűşünülmüřtür.

AML tedavisinde, hücrenel diferansiasyon ile apopitozisin indűklenmesi ve antiproliferatif etkinin tümünün en yüksek oranlarda sağlanması amaçlanmaktadır. Bizim alışmamızda kullandığımız başta ATRA-deksametazon-vitamin D3 olmak üzere yüksek doz deksametazon grupları ile ATRA-deksametazon gruplarının lösemik hücre diferansiasyonu ve apopitozisi iyi derece indűkleyebildikleri ve çok iyi antiproliferatif etkinlik sayesinde lösemik hücre sayılarını azaltabildiklerini gözledik. Bu sonuçlar, bu ilaçların klinikte AML tedavisinde tek başlarına veya kombine olarak yukarıda bahsettiğimiz mevcut etkileri ile kullanılabileceğini telkin etmektedir. Bu grupların dışında kalan tekli ve ikili ilaç kombinasyonlarının kısmen faydalı etkinlikleri saptanmış olup klinik uygulamalarda sınırlı yararlarının sınırlı olabileceğini dűşünmekteyiz.

Vitamin D3'ün hiperkalsemi yapıcı, ATRA'nın da retinoik asit sendromuna neden olucu yan etkileri bulunduğundan tedaviye eklenebilecek deksametazonun yukarıda bahsedilen yan etkilerin tedavisinde kullanılıyor olması nedeniyle birlikte kullanılmalrının klinik uygulamalarda ayrıca faydalı olabileceğini dűşünmekteyiz.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular, ilaçların etkin olmasında deksametazonun ilave edilmesinin son derece olumlu etki yaptığını göstermiştir.

Çalışmamız bir bütün olarak değerlendirildiğinde, ATRA-deksametazon-vitamin D3 grubu başta olmak üzere deksametazonun yüksek dozlarının ve ATRA-deksametazon kombinasyonunun AML'nin klinik uygulamaları için umut verici olduğunu dűşünmekteyiz.

Tüm bu bulguların sonucunda klasik tedavilerde yer almayan bu üç ilacın gelecekteki geniş kapsamlı yeni çalışmaların desteği ile AML tedavisinde yer alabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1- Deksametazon yüksek dozlarda AML hücrelerinde diferansiasyonu, apoptozisi indüklerken hücre çoğalmasını durdurabildiği gözlenmiştir. Ayrıca steroidlerin ATRA, vitamin D3 ile kombine kullanımının aditif etki yaratabileceği saptanmıştır.
- 2- ATRA ve vitamin D3 tek başına kullanıldıklarında kısmen etkili olabildiği ve daha çok bu etkinin diferansiasyonu indüklemek tarzında olabileceği gözlenmiştir.
- 3- Bu ajanların kombine kullanımında, kombinasyonun ana ilacı deksametazon olup özellikle 3'lü kombinasyonda belirginleşen aditif bir özellik göstererek diferansiasyonu ve apoptozisi indüklerken en güçlü antiproliferatif etkinliğin ortaya konabildiği gözlenmiştir.
- 4- Özellikle yüksek doz deksametazon, ATRA ve vitamin D3 kombinasyonlarının etkinliğini araştırmak üzere genişletilmiş çalışmalar yapılması gerekmektedir.

7. ÖZET

Glasi - am nci
AML tedavisinde, son 10 yıl içinde klasik antiproliferatif ve litik tedavinin yanında diferansiasyon tedavisi tartışılmaya başlanmış ve klinik uygulamaya girmeye başlamıştır.

MM Bu tez çalışmamızda 7 yeni tanı konmuş AML M3 dışındaki AML'li hastalardan elde edilen hücreler üzerinde deksametazon, ATRA ve vitamin D3'ün proliferasyon (flow cytometrik) diferansiasyon (morfoloji, LAP skoru, fagositik aktivite) ve apoptotik yeteneklerini hücre kültür ortamında araştırdık.

Sonuç? Gerek diferansiasyonda, gerekse antiproliferatif etkide, ~~başta~~ başta ATRA-deksametazon-vitamin D3 olmak üzere, ^{yüksek doz deksametazon ve ATRA-deksametazon} yüksek doz deksametazon ve ATRA-deksametazon kombinasyonlarının etkili olduğu bulundu. Ancak hücrelerde apoptozisin uyarılmasında en etkin ajanın deksametazon olduğu saptandı. Deksamatazonun artan dozlarında bu etki daha belirgindi. Diğer ilaç gruplarının tümünde de hafif derecede anlamlı yararlı etkilere rastlanmıştır. ($p > 0.05$)

TARTIŞILMA Bu bulguların sonucunda klasik tedavilerde yer almayan ATRA-deksametazon-vitamin D3 ilaç kombinasyonunun ve özellikle yüksek doz deksametazon içeren ilaç gruplarının ilerdeki daha kapsamlı çalışmaların desteğiyle klinik uygulamalar için umut verici olabileceğini düşünmekteyiz.

8. SUMMARY

THE EFFECTS OF ATRA, VITAMIN D3 AND DEXAMETHASONE ON ACUTE MYELOID LEUKEMIC CELLS

During the last 10 years for the treatment of AML, beside antiproliferative and lytic therapy, differentiation therapy had been started to be discussed and to be used in clinical application.

In this study, we investigated the differentiation (morphologically, LAP score, phagocytic activity), proliferation (flow cytometric) and apoptotic abilities of the dexamethasone, ATRA and vitamin D3 on the cells of the newly diagnosed 7 AML patients in the cell culture environment.

It was found that drug combinations, in a sequence of primarily ATRA-dexamethasone-vitamin D3 and high dose dexamethasone and ATRA-dexamethasone were effective in both differentiation and antiproliferative effect respectively. However dexamethasone was observed to be the most effective agent for induction of apoptosis. This effect was more pronounced at the increased doses of dexamethasone. In all of the other groups mild degree beneficial effects were seen.

As a consequence of these results, we think that drug combinations like ATRA – dexamethasone-vitamin D3 and especially high dose dexamethasone which are not included in classical therapies may be hopeful for the future clinical applications with the support of new studies.

9. KAYNAKLAR

- 1- Haznedar R: Hematolojik hastalıklar. İlicin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalin S, Süleymanlar G, (Ed): Temel İç Hastalıkları 1. baskı, Güneş kitabevi, Ankara, 1996, s. 1285.
- 2- Wetzler M, Bloomfield C: Acute and chronic myeloid leucemia. Fauci A, Braunwald E, Isselbacher K, Wilson J, Martin J, Kasper D, Hauser S, Longo D (eds) : Principles of Internal Medicine ,Fourteenth Edition, Mc Graw-Hill, 1998, p. 689.
- 3- Norgaard P, Paulsen HS: Glucocorticoid receptors in human malignancies. Annals of Oncology, 2: 542-557, 1991.
- 4- Miyoshi H, Ohki M, Nakagaura T, Honma Y: Glucocorticoids induce apoptosis in acute myeloid leukemia cell lines with A t(8;21) chromosome translocation. Leukemia Research, 21: 45-50, 1997.
- 5- Özsoylu Ş: High dose intravenous methylprednisolone in haematologic disorders. Hematology, 44: 197-207, 1990.
- 6- Lee YY, Kim ES, Scol JG, Kim BK, Binderup L, Elstner E, Park DJ, Koefler HP: Effect of a vitamin D3 analog, EB 1089, on hematopoietic stem cells from normal and myeloid leukemic blasts. Leucemia, 10: 1751-1757, 1996.
- 7- Collins JS: Pathobiology of human acute myeloid leukemia. Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H, Silberstein L: Hematology Basic Principles and Practice. Second edition, Churchill Livingstone, New York, 1995, pp. 983-1008.
- 3- Öbek A: İç Hastalıkları, 4. baskı, Güneş kitabevi, Bursa, 1990, s. 770.
- 2- Greer J, Kinney MC: Acute nonlymphocytic leukemia. Lee R, Bithell T, Foerster J, Athens J, Lukens J (eds): Wintrobe's clinical hematology, ninth edition, Lea Febiger, Malvern, 1993, pp. 1920-1937.

- 10- DiBona E, Montaldi A, Guercini N, Rossi V, Luiciano A, Biondi A, Rodeghiero F: A (15;17) translocation not associated with acute promyelocytic leukemia. *British Journal of Hematology*, 95: 706-709, 1996.
- 11- Dekker AN: Meningeal involvement in patients with acute nonlymphocytic leukemia, incidence, management, and predictive factors. *Cancer*, 56: 2078, 1985.
- 12- Scheinberg D, Maslak P, Weiss M: Acute Leukemias: Devita V, Helman S, Rozenberg S: *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 5th edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, pp. 2293-2316.
- 13- Mandelli F: Risk adapted treatment of acute myelocytic leukemia. Löwenberg B, Degos L, Willemze R, McArthur J, Kansu E: *Educational Program Book*, Amsterdam, 1998, pp. 105-107.
- 14- Rowe MJ: Acute leukemias in adults. Mazza JJ (ed): *Manual of clinical hematology*, second edition, Little Brown, Boston, 1995, p. 222-236.
- 15- Champlin R, Gale RP: Acute myelogenous leukemia: Recent advances in therapy. *Blood*, 69: 1551, 1987.
- 16- Estey E, Kantarjian H, Keating M: Therapy for acute myeloid leukemia. *Hematology Basic Principles and practice*. Second edition, Churchill Livingstone, New York, 1995, pp. 1014-1024.
- 17- Gale RP: Transplant or chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *Lancet*, 12: 1119, 1989.
- 18- Santos GW: Marrow transplantation in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood*, 74: 901, 1989.
- (1)
- 19- Dong F, Hoefsloot LH, Schelen AM: Identification of a nonsense mutation in the granulocyte-colony-stimulating factor receptor in severe congenital neutropenia. *National Academic Science*, 91: 4480-4484, 1994.
- (2)
- 20- Baurette RP, Myles GM, Carberg K, Chen AR, Rohrschneider LR: Uncoupling of the proliferation and differentiation signals mediated by the murine macrophage colony-stimulating factor receptor expressed in myeloid FDC-P1 cells. *Cell Growth Differentiation*, 6: 631-645, 1995.

- 21- Orkin SH: Transcription factors and hematopoietik development. *Journal Biologic Chemistry*, 270: 4955-4958, 1995.
- 22- Olsson I, Ehinger M, Gullberg U: Cell differentiation in acute myeloid leukemia. *European Journal of Haematology*, 57: 1-16, 1996.
- 23- Degos L, Dombret H, Chomienne C: All-trans retinoic acid as differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 85: 2643-2653, 1995.
- 24- Mayes PA: Yağda çözünen vitaminlerin yapı ve fonksiyonu (Çev. B Ersöz). Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW: *Harper'in Biyokimyası* (Çev. Menteş G, Ersöz B). 1. Baskı Barış Kitabevi İstanbul, 1993, s. 704-713.
- 25- Masciulli R, Testa U, Barberi T, Samoggia P, Tritanelli E, Pustarino R, Mastroberardino G, Camagna A, Peschle C: Combinet vitamin D3 / retinoic acid induction of human promyelocytic cell lines: enhanced phogocytic cell maturation and hybrid granulomonocytic phenotype. *Cell Growth diferantiation*, 6: 493-503, 1995.
- 26- Warrel RP, de The H, Wang Z-Y, Degos L: Acut promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*, 329:177, 1993 .
- 27- Barbui T, Finazzi G, Falanga A: the management of bleeding and thrombozsis in leukemia, Henderson ES, Lister TA, Greaves MF (eds): *Leukemia*. Philadelphia, PA, Saunders, 1996, p 291.
- 28- Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Donti E, Biondi A, Lo Coco F, Grignani F, Pelicci PG: Acut promyelocytik leukemia: From genetics to treatment. *Blood*, 83: 10, 1994.
- 29- Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballerini P, Fenaux P, Degos L: All-trans retinoic acid as a differentiation therapy fo acute promyelositic leukemia. *Blood*, 76: 1704, 1990.
- 30- Castaigne S: Recent advenses in acut leukemias. Akova N, Biondi A, Brugger W, Castaigne, Demirer T, Estey E (ed): *Recent advenses in acut leukemias*, birinci baskı Hacettepe üniversitesi, Ankara, 1997, S. 45-47.

- 31-Pallis M, Tirzanski J, Russel NH: Blast maturity and CD34 expression determine the effects of the diferantiating agent KH 1060 and 9-cis-retinoic acid on the diferantiation clonogenicity of non-M3 acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 12: 1741-1748, 1998
- 32-Pisani F, Del Poeta G, Aranica G, Venditti A, Caravita T, Amadoris: İnvitro down regülation of bcl-2 expression by all-trans retinoic acid in AML blasts. *Annal of Hematology* 75: 145-147, 1997.
- 33-Ersöz B: Adrenel koteks hormonları. Menteş G, Ersöz B: Harper in biyokimyası. 1. baskı, Barış kitap evi, İstanbul, 1993, S. 625-640
- 34-Becker PS, Li Z, Potselueva T, Madri JA, Newburger PE, Berliner N: Laminin promotes differentiation of NB4 promyelocytic cells with all-trans retinoic acid. *Blood*, 88:261-267, 1996.
- 35-Herault O, Damenech J, Degenne M, Bremand JL, Senseke L, Bernart MC, Binet C, Colombat P: All trens retinoic acid up regulates CD 38 but not c-KIT antigens on human marrov CD 34 + cells vithaut recruitment into cell cycle. *Briths Journal of Hematology*, 103: 343-350, 1998.
- 36-Gianni M, Li Calzi M, Terao M, Guiso G, Caccia S, Barbui T, Rambaldi A, Garattini E: AM580, a stable benzoic derivative of retinoic acid, has powerfull and selective cyto-diferantiating effects acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*, 87: 1520-1531, 1996.
- 37-Ki MH, Paik KJ, Lee JH, Chung HY, Lee KH, Kim KW, Kim ND: All Trans Retinoic acid induced differentiation of rat mamory epithelial cells cultured in cerum-free medium. *Archieve of Pharmacology Research*, 21: 298-304, 1998.
- 38-Yaguchi M, Miyazawa K, Katagiri T, Nishimaki J, Kizaki M, Tohyama K, Toyama K: Vitamin K2 and it's derivatives induce apoptozis in lekemia cells and enhance the effect of all-trans retinoic acid. *Leukemia*, 11: 779-787, 1997.
- 39-Labaume S, Chopin M, Pla M, Brout JC: Diffrential invitro and invivo effects of alltrans retinoic acid on the growth of human myeloma cells. *Leukemia and Lymphoma*, 30: 361-366, 1998.
- 40-Başaklar C, Sıvı ve elektroitler fizyoloji ve potofizyoloji. 1. baskı, barış kitabevi, Ankara, 1994, S. 295.

- 41- Munker R, Kobayashi T, Elstner E, Norman A, Uskokovic M, Zhang W, Andreeff M, Kofler P: A new series of vitamin D analogs is highly active for clonal inhibition, differentiation and induction of WAF 1 in myeloid leukemia. *Blood*, 88: 2201-2209, 1996.
- 42- Asada M, Yanmada T, Fukumuro K, Mizutani S: p21 Cip1/WAF1 is important for differentiation and survival of U937 cells. *Leukemia*, 12: 1944-1950, 1998.
- 43- Verlianden L, Verstuyf A, Convents R, Marcelis S, Van Camp M, Bouillon R: Action of 1,25 (OH) 2 D 3 on the cell cycle genes, cyclin D 1, p21 and p27 in MCF-7 cells. *Molecular Cell Endocrinology*, 142: 57-65, 1998.
- 44- Mills KI, Gilkes AF, Sweeney M, Choudhry MA, Woodgate LJ, Bunce CM, Brawn G, Burnett AK: Identification of a retinoic acid responsive aldoketoreductitase expressed in HL 60 leukaemik cells. *FEBS Lett.* 440: 158-162, 1998.
- 45- Danielsson C, Fehsel K, Polly P, Carlberg C: Differential apoptotic response of human melanoma cells to 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues. *Cell Death Differentiation*, 5: 946-52, 1998.
- 46- James SY, Williams MA, Kelsey SM, Newland AC, Colston KW: The role of vitamin D derivatives and retinoids in the differentiation of human leukaemia cells. *Bioc. Pharma*, 1:625-634, 1996.
- 47- Sönmez M: İnsan Multiple myeloma vakaları, NS1 ve SP2 fare myeloma hücre dizilerinde metil pretnizolonun doza bağlı etkileri. Uzmanlık tezi, KTÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.B.D. Trabzon 1996, s. 10-14 .
- 48- Kayaalp SO: Tibbi Farmakoloji. Dördüncü baskı. Feryal Matbacılık, Ankara, 3.cilt, 1989, s. 2421-2421.
- 49- Carson AD, Ribeiro JM: Apoptosis and disease. *Lancet*, 341 (8855): 1251-1254, 1993.
- 50- Sachs L, Lotem J: Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: New implications for therapy. *Blood*, 82: 15-21, 1993.
- 51- Schwartzman RA, Cidlowski JA: Mechanism of tissue-specific induction of internucleosomal deoxyrinucleic acid cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. *Endocrinology*, 133: 591-599, 1993.

- 52-Norgaard P, Poulsen HS: Glucocorticoid receptors in human malignancies: A review. *Annals of Oncology*, 2: 542-557, 1991.
- 53-Smets LA, Vanden Berg TJ, Acton D, Top B, Van Rooij H, Verwijs-Janssen M: BCL-2 expression and mitochondrial activity in leukemic cells with different sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Blood*, 84: 1613-1619, 1994.
- 54-Lichtenstein A, Tu Y, Fady C, Vescio R, Berenson J: Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell-Immunology*, 162:248-255, 1995.
- 55-Moalli PA, Pillay S, Weiner D, Leikin R, Rosen ST: A mechanism of resistance to glucocorticoids in multiple myeloma: Transient expression of a truncated glucocorticoid receptor mRNA. *Blood*, 79: 231-222, 1992.
- 56-Gillis S, Crabtree GR, Smith KA: Glucocorticoid induced inhibition of T cell growth factor production. *The Journal of Immunology*, 123: 1624-1631, 1979.
- 57-Migliorati G, Nicoletti I, D'adamio R, Spreca A, Pagliacci C, Riccardi C: Dexamethasone induces apoptosis in mouse natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*, 81: 21-26, 1994.
- 58-Hiçsönmez G, Onat N, Albayrak D, Yetgin S, Özsoylu Ş: Acceleration of leukocyte recovery by administration of short course high-dose methylprednisolone in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Hematology and Oncology*, 8: 193-197, 1991.
- 59-Hiçsönmez G, Özsoylu Ş, Tuncer AM: Differentiation of myeloid leukemic cells induced by high-dose methylprednisolone in patients with acute myeloblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia Research*, 15: 537-541, 1991.
- 60-Alexanian R, Yap BS, Bodey GP: Prednisone pulse therapy for refractory myeloma. *Blood*, 62: 572-577, 1983.
- 61-Alexanian R, Barlogie B, Dixon D: High dose glucocorticoid treatment of resistant myeloma. *Annals of Internal Medicine*, 105:8-11, 1986.
- 62-Lotem J, Sachs L: Control of sensitivity to induction of apoptosis in myeloid leukemic cells by differentiation and bcl-2 dependent and independent pathways. *Cell Growth Differ*, 5: 321-327, 1994.

- 74- Wohl CA, Weiss S: Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors. *J Neurobiol*, 37: 281-90, 1998.
- 75- Offterdinger M, Schneider SM, Huber H, Grunt TW: Retinoids control the expression of c-erb B receptors in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 251: 907-13, 1998.
- 76- Roselon A, Favaretto G, Masarotto G, Cavazzano A, Zanesco L, Francella E: Effects of all trans retinoic acid and interferon alpha in peripheral neuroectodermal tumor cell cultures and xenografts. *Int J Oncol*, 13: 943-949, 1998.
- 77- Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JV: Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci*, 95: 8806-11, 1998.
- 78- Barroga EF, Kadossawa T, Asono K, Okumura M, Fujinaga T: Apoptosis induction of POS canine osteosarcoma cells by vitamin D and retinoids. *J Vet Met Sci*, 60: 1269-72, 1998.
- 79- Oridate N, Lotan D, Xu Xc, Hong WK, Lotan R: Differential induction of apoptosis by all trans retinoic acid and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *Clin Cancer Res*, 2: 855-63, 1996.
- 80- Gueddari N, Bobichon H, Depierreux C: Enhancement of all trans retinoic acid efficiency low density lipoprotein. *Int J Oncol*, 13: 1069-75, 1998.
- 81- Mathiansen IS, Colston KW, Binderup L: EB 1089, a novel vitamin D analogue, has strong antiproliferative and differentiation inducing effects on cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46: 365-71, 1993.
- 82- Nolan E, Donepudi M, Van Weelden K, Flanagan L, Welsh J: Dissociation of vitamin D3 and anti-estrogen mediated growth regulation in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 188: 13-20, 1998.
- 83- Kawamura A, Tamaki N, Kokunai T: Effect of dexamethasone on cell proliferation of neuroepithelial tumor cell lines. *Neurol Med*, 38: 633-638, 1998.
- 84- Fernberg JO, Lewensohn R, Skog S: Interaction of melphalan and dexamethasone in a human myeloma cell-line. *Anticancer drugs*, 2: 565-570, 1991.

- 85- Collado D, Mollinedo F: Dexamethasone modifies the functional responses of the granulocytic differentiating HL60 cells. *Biochem J*, 299: 553-559, 1994.
- 86- Camagna A, Teta U, Masciulli R: The synergistic effect of simultaneous addition of retinoic acid and vitamin D3 on the in vitro differentiating of human promyelocytic leukemia cell lines could be efficiently transposed in vivo. *Med Hypotheses*. 50: 253-257, 1998.
- 87- Elstner E, Linker M, Umiel T: Combination of a potent 20 epi-vitamin D3 analogue (KH 1060) with 9 cis retinoic acid irreversibly inhibits clonal growth, decreases bcl-2 expression, and induces apoptosis in HL 60 leukemic cells. *Cancer Research*, 56: 3570-3576, 1996,
- 88- Testa U, Grignani F, Barberi T: PML/RAR alpha U 937 mutant and NB4 cell lines: Retinoic acid restores the monocytic differentiation response to vitamin D3. *Cancer Research*, 54: 4508- 4515, 1994.
- 89- Beresford JN, Joyner CJ, Devlin T: The effects of dexamethasone and 1, 25-dihydroxy vitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. *Archs Oral Biol*. 39:941-947, 1994.

- 63- Escobar D, Mollineda F: Dexamethasone modifies the functional responses of the granulocytic differentiating HL 60 cells. *Journal of Biochemistry*, 299: 553-559, 1994.
- 64- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y: Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 53: 3976-85, 1993.
- 65- Banker DE, Radich J, Becker A, Kerkof K: The t (8;21) translocation is not consistently associated with high Bcl-2 expression in de novo acute myeloid leukemias of adults. *Cancer res*, 4: 3051-3062, 1998.
- 66- Lotem J, Sachs L: Control of sensitivity to induction of apoptosis in myeloid leukemic cells by differentiation and bcl-2 dependent and independent pathways. *Cell Growth Differentiation*, 5: 321-327, 1994.
- 67- Kizaki M, Uenott, Yamazoe Y, Shimada M, Takayama N, Muto A, Matsushita H, Nakajima H, Morikawa M, Koeffler P, Ikeda Y: Mechanisms of retinoid resistance in leukemic cells: possible role of cytochrome P450 and P-Glycoprotein. *Blood*, 2:725-733, 1996.
- 68- Van der Hem K.G, Drager A.M, Huijgens PC, Tol C, Deville W, Langenhuijsen M: The differentiation inducing effect of Bryostatin 5 on human myeloid blast cells is potentiated by vitamin D3. *Leukemia* 8: 266-273, 1994.
- 69- Bellows C, Wang Y, Heersche J, Aubin J: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates adipocyte differentiation in cultures of fetal rat calvaria cells: Comparison with the effects of dexamethasone. *Endocrinology*, 5: 2221-2229, 1994.
- 70- Robinson JP: *Hand Book of Flow Cytometry Methods*. Wiley-Uss, New York, 1993, p.112.
- 71- Bonnefoy-Berard N, Genestier L, Flacher M, Rouault JP, Lizat G, Muty M, Revillard JP: Apoptosis induced by polyclonal antilymphocyte globulins in human B-cell lines. *Blood*, 83: 1051-1059, 1994.
- 72- Kan O, Whetton D, Heyworth M: Development of haemopoietic cells in liquid culture. Testa N, Molineux G: *Haemopoiesis a practical approach*. 1 ST edition, Oxford University press, Molineux, 1993. p. 126.
- 73- Rambaldi A, Teraom M, Bettoni S, Tini M, Bassan R, Barbui T, Garathini E: Expression of leukocyte alkaline phosphatase gene in normal and leukemic cells: regulation of the transcript by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 12: 2565-2571, 1990.