T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

APİGENİNİN KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ; MEKANİSTİK BİR YAKLAŞIM

Proje No:
TCD-2015-5427

Proje Türü
Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Adı Soyadı Prof Dr Ali Ünal
Birimi/Bölümü Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı Arş Gör Özge GÖKTEPE
Birimi/Bölümü Tıp Fakültesi Histoloji&Embriyoloji Anabilim Dalı

Şubat 2017

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Abdullah Gül Üniversitesi, Yaşam ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji & Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof Dr Yusuf Baran'a her türlü yardımlarından ve desteğinden dolayı,

Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji&Embriyoloji Anabilim Dalı üyesi Arş Gör Özge GÖKTEPE'ye her türlü yardımlarından ve desteğinden dolayı,

Çalışmamızı destekleyen, bilgi ve tecrübelerini aktaran, emek ve hoş görüsünü hiçbir zaman esirgemeyen Genom ve Kök Hücre Merkezi personeline,

Çalışmamızı destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi'ne, teşekkürlerimi sunarım

Prof Dr Ali ÜNAL

Şubat 2017

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2.GENEL BİLGİLER	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM	10
4. BULGULAR	12
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	16
6.KAYNAKLAR	18

ÖZET

Kronik miyeloid lösemi (KML), BCR/ABL onkoproteininin varlığı ile karakterize kan ve kemik iliği kök hücrelerinden kökenlenen bir hastalıktır. BCR/ABL onkoproteini, ABL kinaz bölgesini içeren 9. kromozom ve 22. kromozom üzerindeki özgül bir BCR' nin karşılıklı translokasyonu sonucunda meydana gelir. BCR/ABL füzyon proteini, yapısal olarak aktif bir tirozin kinazdır ve hücre büyümesi ve çoğalması, programlı hücre ölümü (apoptoz) ve hücrelerin farklılaşmasını içeren birçok sinyal yolağını düzenler. Bu protein, hematopoetik hücrelere hayatta kalım ve çoğalma avantajı sağlar. Seçici bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib mesilat' ın keşfi, önemli ölçüde ortanca sağkalımı iyileştirilmesi nedeniyle kronik faz KML yönetiminde bir devrim olmuştur. Bununla beraber imatinib direncinin ortaya çıkması, yeni tedavi metodları gerektiren ciddi bir sorun olmuştur. Apoptoz, kanser tedavisine cevapta ana hücre ölümü mekanizmalarından biridir. Apoptoz, Bcl-2 ailesi üyesi; apoptozu kolaylaştıran proteinler ve apoptozu önleyen proteinler arasındaki karmaşık bir dizi etkileşim ile kontrol edilir. KML' de, Bcl-2' yi ve kaspaz yolağını hedef alan tedavi seçeneklerinin hücre proliferasyonu baskılayarak ve hücre apoptozunu arttırarak yararlı olabileceği gösterilmiştir. Apigenin, maydanoz, soğan, bazı baharatlar, portakal, çay, papatya, buğday filizi gibi sebze ve meyvelerde bolca bulunan, anti-proliferatif, anti-inflamatuvar ve anti-metastatik aktiviteye sahip, iyi tanımlanmamış bir flavondur. Apigenin, diğer yapısal ilişkili flavonoidlere göre tümör hücrelerine karşın normal hücreler üzerine çarpıcı etkileri ve düşük içsel toksisite nedeniyle yararlı ve sağlığı geliştirici olarak özellikle son yıllarda ilgi kazanmıştır. Apigenin tedavisi ile apoptoza eğilim artmaktadır. Apigenin; meme, serviks, kolon, akciğer, over, prostat, cilt, tiroid, endometriyal, mide, karaciğer, adrenokortikal tümörler, nöroblastom ve bazı lösemi tiplerinde çalışılmıştır. Ancak literatürde, kronik myeloid lösemide Apigenin ile yapılmış yeterli sayıda çalışma yoktur. Bu çalışmada, tümör hücrelerinin apoptozu üzerine güçlü etkisi olduğu bildirilen Apigenin' in, KML hücreleri üzerinde de etkili olabileceği ve bu etkilerin kaspaz yolağı üzerinden olabileceği öngörülmektedir. Bununla ilgili olarak bu çalışmada, Apigenin' in imatinib duyarlı ve imatinib dirençli KML kök hücreleri üzerine apoptotik etkileri incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apigenin, Kronik Myeloid Lösemi, Apoptoz

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a disease characterized by the presence of BCR / ABL oncoprotein and blood and bone marrow stem cells . The BCR / ABL oncoprotein is the result of mutual translocation of the 9th chromosome containing the ABL kinase domain and a specific BCR on the 22nd chromosome. The BCR / ABL fusion protein is a structurally active tyrosine kinas and regulates many signaling pathways including cell growth and proliferation, programmed cell death (apoptosis), and cell differentiation. This protein has the advantage of survival and proliferation in hematopoietic cells. The discovery of imatinib mesylate, a selective tyrosine kinase inhibitor, has revolutionized the management of chronic phase CML because of the significant improvement in median survival. However, the emergence of imatinib resistance has been a serious problem requiring new treatment methods. Apoptosis is one of the main cell death mechanisms in response to cancer therapy. Apoptosis, Bcl-2 family member; A complex series of interactions between apoptosis-facilitating proteins and apoptosis-suppressing proteins. In CML treatment options targeting Bcl-2 and caspase pathway have been shown to be beneficial by suppressing cell proliferation and increasing cell apoptosis. Vegetables such as apigenin, parsley, onion, some spices, oranges, tea, daisy, wheat sprouts and a well-defined flavonoid. Apigenin has gained particular interest in recent years as a beneficial and health-promoting agent due to its striking effects on normal cells versus tumor cells and low internal toxicity compared to other structurally related flavonoids. apigenin treatment increases the apoptotic tendency. Apigenin; Breast, cervix, colon, lung, over, prostate, skin, thyroid, endometrial, stomach, liver, adrenocortical tumors, neuroblastoma and some types of leukemia. However, there are not enough studies in the literature with apigenin in chronic myeloid leukemia. In this study, it is predicted that apigenin, which is reported to be a potent effect of tumor cells on apoptosis, may also be effective on CML cells and these effects may be via caspase pathway. In this work, Apigenin's apoptotic effects on imatinib-sensitive and imatinib-resistant chronic myeloid leukemia stem cells were examined in this study.

Key words: Apigenin, Chronic myeloid leukemia, Apoptosis

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik myeloid lösemi (KML), 2010 kDa ağırlığındaki BCR-ABL (p210) füzyon proteinini kodlayan Philadelphia (Ph) kromozomu ile karakterize edilen bir lösemi türüdür. BCR-ABL proteinini hedefleyerek aktivitesine engelleyen tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKİ) geliştirilmesi ve ilaçların KML hastalarında uygulanması ile önemli başarılar elde edilmesine karşın hastalarda bu ajanlara karşı geliştirilen dirençlilik, KML tedavisinde mutlak başarıyı kısıtlamaktadır. Dirençlilik probleminin temel nedenlerinden biri de uygulanan ajanların KML kök hücreleri üzerine etkinlik göstermemesidir. Literatürde, doğal bir bileşik olan Apigenin'in, farklı kanser türlerinde etkili olduğunu gösteren bir çok çalışma mevcut olmasına karşın, Apigenin'in KML kök hücreleri üzerine etkilerini ortaya koyan herhangi bir proje veya yayın yoktur. Apigenin'in, KML kök hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskılayabileceği ve apopitozu uyarabileceği ve bu etkinin ilaç direnci problemini aşmada yardımcı olabileceği öngörülmektedir. Bu çalışmamızda, apigeninin K562 KML kök hücreleri üzerine terapötik potansiyelini belirlemeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

Kronik myeloid lösemi (KML), özgül kromozomal defekte sahip kemik iliği kök hücrelerinin kötü huylu gelişim gösteren klonal bir hastalığıdır ve (Ph) kromozomu adı verilen özel bir kromozal anormallik ile karakterize edilmektedir. Ph kromozomu, 9. ve 22. kromozomlar üzerinde bulunan BCR ve ABL genlerinin translokasyonu ile meydana gelmekte ve bu translokasyon sonucu oluşan hibrid gen, hücrenin kontrolsüz büyümesini ve bölünmesini sağlayan sinyal ileti yollarını aktif hale getiren tirozin kinaz aktivitesine sahip BCR/ABL olarak adlandırılan proteini kodlamaktadır. BCR/ABL aktivitesini hedef alan tirozin kinaz inhibitörleri ile hastalıkla mücadelede büyük başarılar elde edilmiş olmasına rağmen, ilaç direnci gelişimi bu ilaçlara karşı klinikte karşılaşılan en önemli problem olarak görülmektedir. Bu sebepten dolayı, kan ve kemik iliğinde ilkel hücrelerin birikmesi ile sonuçlanan direnç problemini aşmak için pek çok çalışma yürütülmektedir. Ancak son yıllarda KML'nin tedavisi için KML kök hücreleri hedef alan tedavilerin geliştirilmesi için çalışılmalar geliştirilmektedir. Tüm farklı kanser kök hücrelerinin limitsiz çoğalma potansiyeli ve diğer organlara yayılma (metastaz) yeteneği vardır. Bu nedenle, kanseri tedavisi için kanser kök hücrelerini belirlemek ve hedeflenmesi gerekmektedir. Kanser kök hücreleri izole edilip tanımlanabildiğine göre, daha etkili olabilecek teşhiste kullanılabilecek yeni hücre yüzey belirteçleri ve tedavi hedefleri de bulunmalıdır. Tümör büyümesinin ve metastazın küçük orandaki kanser hücreleri tarafından sağlanması mevcut tedavilerin neden başarısız olduğunu açıklamaktadır. Mevcut tedaviler gerek birincil gerekse metastaz yapmış tümörün küçülmesini sağlar ama bu etki genelde geçici olmakla birlikte hastanın yaşam süresinde önemli bir artış sağlamaz. Bunu iki şekilde açıklamak mümkündür; birincisi, kanser hücrelerinde tedaviye karşı direnç gelişmesi; ikincisi ise, güncel kullanılan tedavilerin kanser kök hücrelerini etkili bir şekilde hedeflememesidir. Bugün var olan tedavi şekilleri tümör hücre topluluğunu öldürecek şekilde geliştirilmiştir. Birçok kanser hücresinin sınırlı çoğalma yeteneği olduğu için, tümör dokusunun küçülmesi bu hücrelerin öldürüldüğünü göstermektedir. Değişik dokulardaki normal kök hücreler, aynı dokudaki olgun hücre tiplerine göre ilaca daha dirençlidirler. Bu durumun altında yatan moleküler mekanizmalar ayrıntılarıyla bilinmemekle birlikte, ancak anti-apoptotik proteinlerin veya ilaca dirençlilik geni gibi ABC taşıyıcılarının yüksek düzeyde sentezlenmesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Aynı durum kanser kök hücreleri için de geçerli olduğu düşünüldüğünde kanser kök hücrelerinin tümör hücrelerinden ilaca daha dirençli olmaları beklenmektedir. Son zamanlarda farklı tip kanserlerden elde edilen kanser kök hücrelerinin günümüzde kullanılan ilaçlara

dirençlilik gösterdikleri yapılan bir çok çalışma ile belirlenmiştir. Bu da kanserle mücadele etmek için kanser kök hücrelerini öldürecek daha etkili tedavilerin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. KML hastalarında, kemik iliğinde normal hematopoetik kök hücreler içerisinde bulunan farklılaşma kümesi (CD)34+ Lin- hücrelerin KML kök hücreler olduğu ve bunların hastalık başlangıcı, ilerlemesi ve imatinib direncinden sorumlu oldukları düşünülmektedir. Benzer olarak, BCR/ABL'in tetiklediği KML'ye sahip olan farelerde, lösemik kök hücreler fenotipik olarak normal hematopoetik kök hücrelere ve BCR/ABL ifade eden hematopoetik kök hücreler (GFP+/Lin/cKit+/Sca-1+) ikinci bir alıcı farede KML'yi tetikleyebilmektedir. Bu CD34+ KML kök hücrelerinin BCR/ABL kinaz inhibitörü imatinib ile in vivo ve in vitro olarak hedeflenemediği ve etkin tedavinin gerçekleştirilemediği bilinmektedir. Özellikle, hücre kültürü çalışmalarında, CD34+ KML kök hücreleri (özellikle bölünmeyen CD34+ hücre popülasyonu) imatinib tarafından inhibisyona hassas değildir. Ayrıca, BCR/ABL transkriptlerinin uzun süreli imatinib tedavisi sonrasında bile halen tespit edilmesi, imatinibin BCR/ABL kinaz aktivitesi yoluyla lösemik kök hücreleri yok edemediğini göstermektedir. Burada, BCR/ABL'de imatinib direncini sağlayan mutasyonların gelişimi ile KML kök hücrelerinin imatinibe hassas olmaması arasında ilişkinin olmadığının görülmesi önemlidir. Bununla beraber, bu sonuçlar bazı bilinmeyen mekanizmaların lösemik kök hücrelerin çoğalmasına ve yaşamını idame etmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Kimyasallar: Çalışmamızda kullanılan kimyasal olan Apigenin Sigma firmasından satın alınmıştır. Söz konusu kimyasal için gerekli stok solüsyonları üretici firma tarafından belirtilen çözücüler içinde hazırlanacak ve uygun saklama koşullarında muhafaza edilmiştir.

3.2.Hücre Hatları ve Kültür Koşulları: Çalışmada Kronik Myeloid Lösemi Kök Hücreleri (KML KH) kullanılmıştır. KML kök hücreleri akım sitometresi ile KML hücrelerinden elde edilip pasajlanmıştır.

3.3.XTT Testi: Apigeninin'in KML kök hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla XTT hücre proliferasyon testi kullanılmıştır. Bu hücreler 72 saat boyunca Apigenininl'e muamele edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, KML kök hücreleri 96-kuyucuklu tabağın her bir kuyucuğunda 100 µl besiyerinde 10.000 hücre olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin üzerine 100'er µl'lik hacimlerde artan konsantrasyonlarda ilgili ajanlar eklenecek ve 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 20 µl XTT reaktifi eklenmiş ve 4 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, 96-kuyucuklu tabaklarda oluşan çözelti spektrofotometre de 450nm dalga boyunda okunmuştur. Spektrofotometrik sonuçlara göre hücre çoğalma grafiği oluşturulmuştur. KML kök hücrelerinde tüm bu ajanların IC50 ve IC10 değeri (ilaç uygulanmayan kontrol grubuna göre hücrelerin çoğalmasının %50 ve %10 baskılandığı ilaç dozu) hücre büyüme grafiğinden hesaplanmıştır.

3.4.Mitokondri Zar Potansiyelindeki Değişikliklerin Belirlenmesi: Apoptozun tetiklenip tetiklenmediğini kontrol etmek amacıyla Apigeninin ile 48 saat boyunca muamele edilen KML kök hücrelerinde mitokondri zar potansiyelinde meydana gelen değişimler, JC-1 mitokondri zar potansiyeli ölçüm kiti (Cayman Chemicals, ABD) ile belirlenmiştir. Bu yöntemde, apoptotik hücrelerde JC-1 boyası sitoplazmada birikirken sağlıklı hücrelerde mitokondride monomerler halinde bulunmaktadır. Mitokondride birikerek 560/595 nm dalga boyunda kırmızı floresan ışıma veren JC-1 boyası, sitoplazmada monomerler halinde bulunmakta ve 485/535 nm dalga boyunda yeşil floresan vermektedir. Hücrelerin 485/560 (yeşil/kırmızı (apoptotik/sağlıklı) floresanda verdiği dalga boyu) değerleri oranlanarak mitokondri zar potansiyelindeki değişimler belirlenmektedir. Bu amaçla, KML kök hücreleri 6-kuyucuklu tabağın her bir kuyucuğunda 2 ml besiyerinde $1x10^6$ hücre olacak şekilde

ekilmiş ve hücreler sadece Apigeninin ile muamele edilerek 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatör de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandığında hücreler toplanarak ayrı ayrı falkon tüplerine alınmış ve 1000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından, hücre pelletinin üzerindeki süpernatant atılmış ve hücre pelleti 300 µl besiyeri ile homojenize edilmiştir. Daha sonra, bu hücrelerin üzerine 30 µl JC-1 boyası eklenmiş ve hücreler 30 dakika süreyle 37 ^{o}C'deki CO_2 inkübatörün de bekletilmiştir. Bu süre sonunda, hücreler 1000rpm hızda 5 dk santrifüjlenmiş ve daha sonra süpernatant atılarak hücre pelleti 200 µl test tampon solüsyonu ile homojenize edilmiştir. Bu işlem basamağı bir kez daha tekrarlanmıştır ve oluşan hücre pelletinin üzerine 320 µl test tampon solüsyonu eklenerek hücrelerin homojenizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra, 96-kuyucuklu siyah tabağa her bir örnekten 100'er µl olacak şekilde üçlü olarak ekim yapılmış ve spektrofotometre de belirtilen dalga boyları altında ölçüm yapılmıştır.

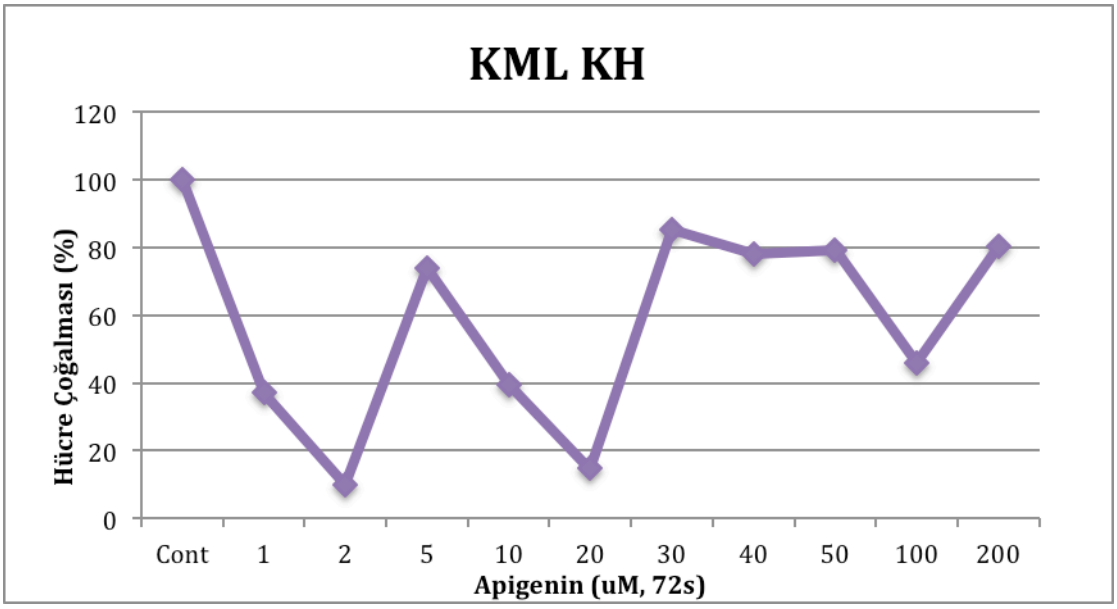
4.BULGULAR

4.1.XTT Sonuçları

DMSO ile çözülen Apigeninin'in KML kök hücrelerinin çoğalması üzerine belirgin bir etkisi görülmemiştir.

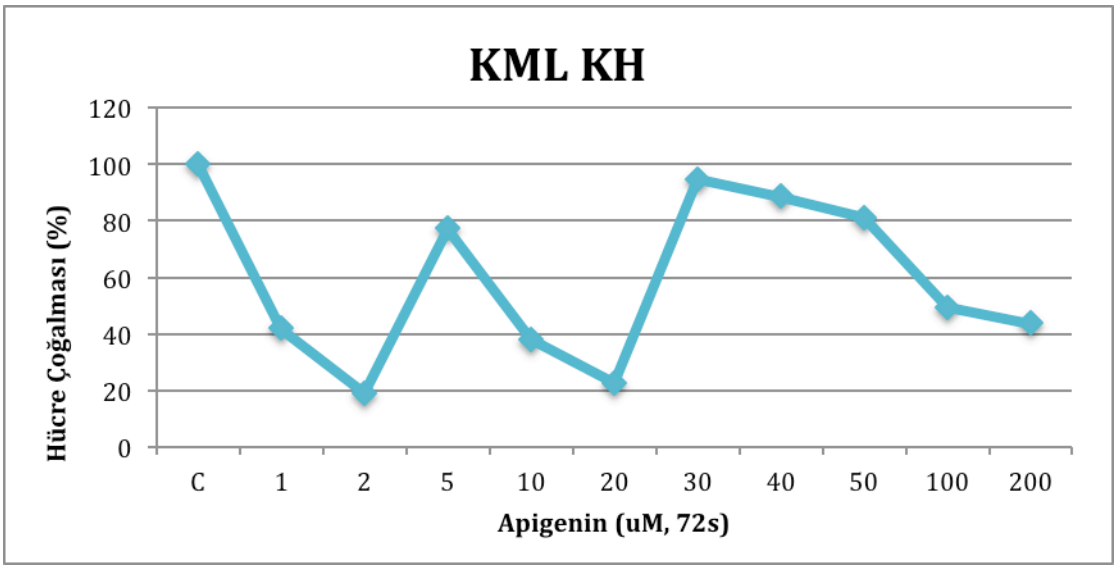
Konsantrasyonları 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 ve 200 uM olan Apigeninin ve XTT KML kök hücreleri üzerine eklenmiş ve 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bunun sonucunda Apigeninin'in sitotoksik ve antiproliferatif etki ile hücre çoğalmasını azaltması beklenirken hücre çoğalması üzerinde belirli bir azalma gözlenememiştir.

XTT testinden elde edilen sonuçlara göre Apigeninin'in KML kök hücrelerindeki IC50 değeri hesaplanamamıştır (Şekil 1).

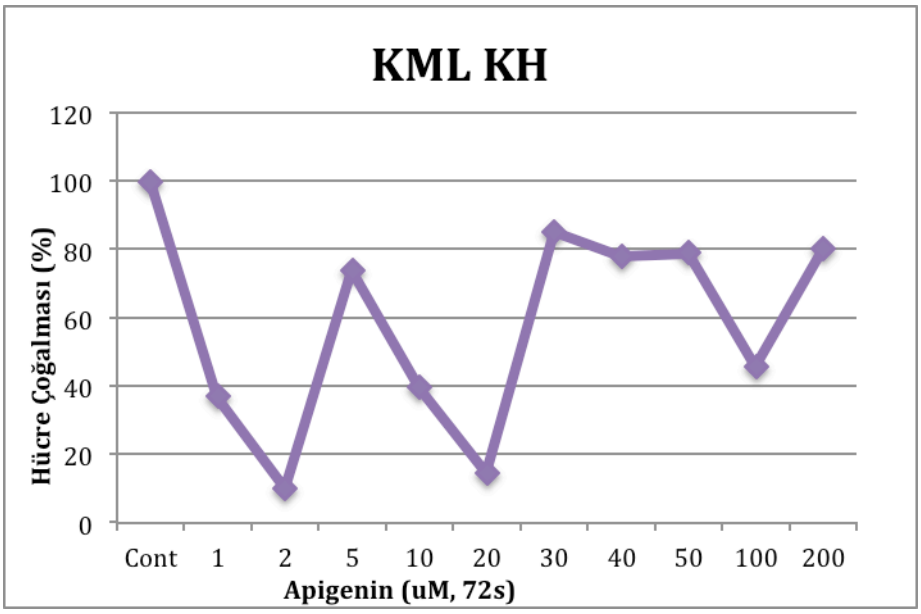


Şekil 1. Apigenin'in KML kök hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

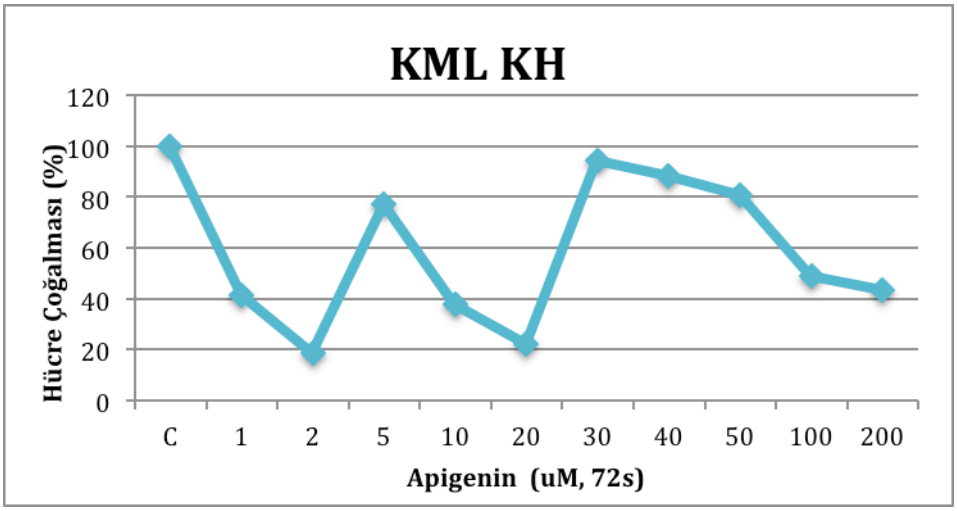
DMSO ile çözülen Apigeninin'in hücre çoğalmasına etkisinin incelendiği XTT Apigeninin konsantrasyonları 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200 uM olacak şekilde 4 kere daha tekrar edilip spektrofotometrik ölçümler sonucu aşağıdaki grafikler elde edilmiştir (Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5) . XTT'nin 5 kez tekrarlanması sonucu elde edilen grafiklerde hücre çoğalmasında herhangi bir azalma gözlenmemiş, IC50 değeri hesaplanamamıştır.



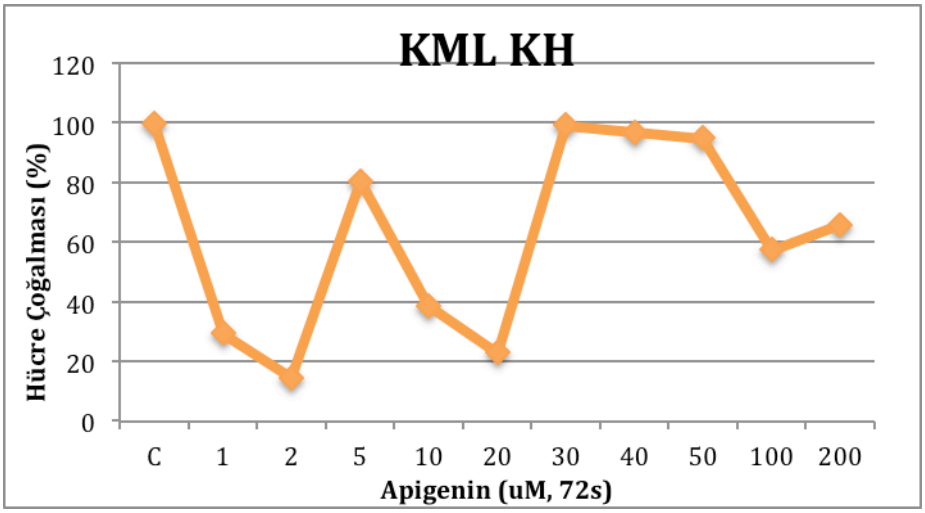
Şekil 2. Apigeninin (DMSO) ’in KML kök hücreleri üzerine sitotoksik etkileri



Şekil 3. Apigeninin (DMSO)’in KML kök hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

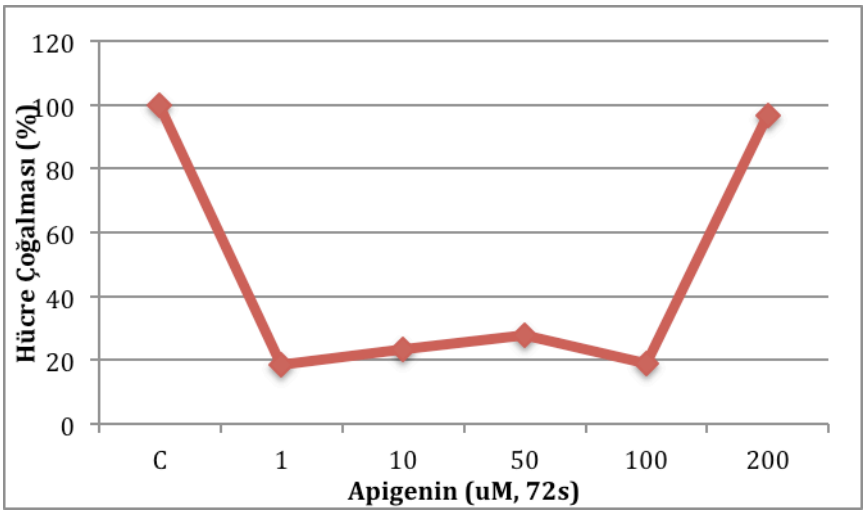


Şekil 4. Apigeninin (DMSO)'in KML kök hücreleri üzerine sitotoksik etkileri



Şekil 5. Apigeninin (DMSO)'in KML kök hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

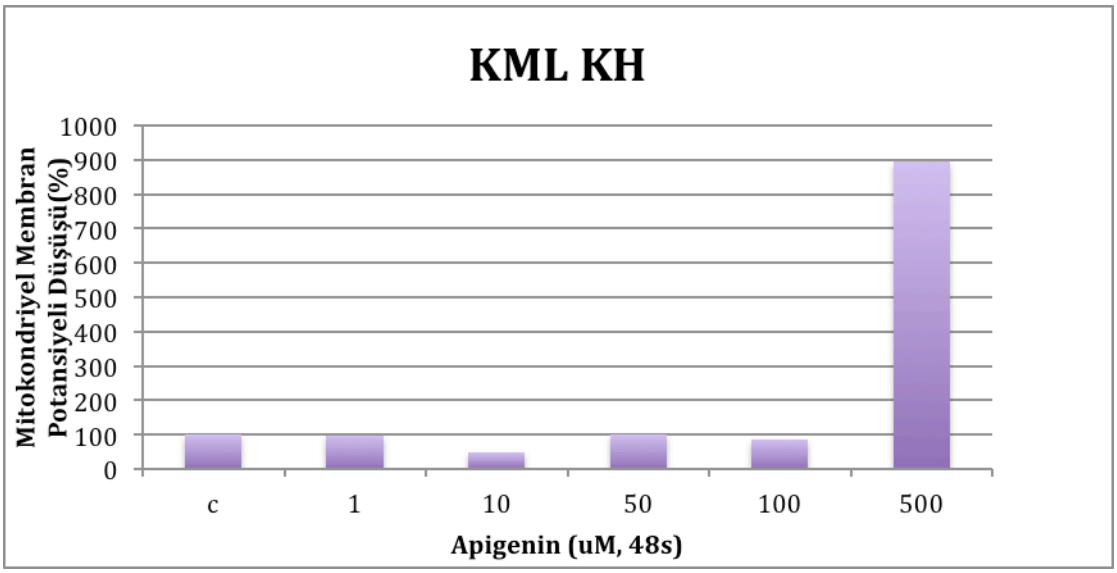
DMSO ile çözülen Apigeninin'den bir sonuç alınamadığı için Apigeninin etanol ile çözülüp Apigeninin konsantrasyonları 1, 10, 50, 100, 200 uM olacak şekilde XTT ile birlikte KML kök hücreleri üzerine uygulanmış 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra yapılan spektrofotometrik ölçümler ile elde edilen grafikte (Şekil 6) etanol içerisinde çözülen Apigeninin'in hücre çoğalması üzerine belirgin bir etkisi gözlenememiş ve IC50 değeri hesaplanamamıştır.



Şekil 6. Apigeninin (Etanol)'in KML kök hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

4.2.Mitokondri Membran Potansiyeli Testi Sonuçları

Apigeninin KML kök hücrelerinde doza bağımlı olarak mitokondri zar potansiyelinin bozulmasını tetiklemektedir (ancak yalnızca çok yüksek dozlarda). Yapılan hücre çoğalma verilerinin ışığında, KML kök hücreleri 48 saat boyunca Apigeninin'in artan dozlarına (1-, 10-, 50-, 100- ve 500uM) maruz bırakılmıştır ve mitokondri zar bozulumundaki değişimler belirlenmiştir. JC-1 testi sonuçlarına göre ise, 48 saat boyunca artan dozlara maruz bırakılan KML kök hücrelerinin mitokondri zar potansiyeli bozulumlarında artış olması beklenirken elde edilen grafikte (Şekil 7) düzenli bir artış gözlenememiştir.



Şekil 7. Artan konsantrasyonlarda Apigeninin uygulanan KML kök hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyellerindeki değişimler.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kronik miyeloid lösemi (KML), BCR/ABL onkoproteininin varlığı ile karakterize kan ve kemik iliği kök hücrelerinden kökenlenen bir hastalıktır (1). BCR/ABL onkoproteini, ABL kinaz bölgesini içeren 9. kromozom ve 22. kromozom üzerindeki özgül bir BCR' nin karşılıklı translokasyonu sonucunda meydana gelir (1). BCR/ABL füzyon proteini, yapısal olarak aktif bir tirozin kinazdır (2) ve hücre büyümesi ve çoğalması, programlı hücre ölümü (apoptoz) ve hücrelerin farklılaşmasını içeren birçok sinyal yolağını düzenler (1). Bu protein, hematopoetik hücrelere hayatta kalım ve çoğalma avantajı sağlar (2). Seçici bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib mesilat (STI571)' ın keşfi, önemli ölçüde ortanca sağkalımı iyileştirilmesi nedeniyle kronik faz kronik miyeloid lösemi (KML) yönetiminde bir devrim olmuştur (3). Bununla beraber imatinib direncinin ortaya çıkması, yeni tedavi metodları gerektiren ciddi bir sorun olmuştur (3). Apoptoz, kanser tedavisine cevapta ana hücre ölümü mekanizmalarından biridir (4). Apoptoz, Bcl-2 ailesi üyesi; apoptozu kolaylaştıran (pro-apoptotik) proteinler (Bax/Bak-benzeri proteinler ve BH3-tek protein) ve apoptozu önleyen (anti-apoptotik) proteinler (örn, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) arasındaki karmaşık bir dizi etkileşim ile kontrol edilir (5). Bcl-2, pro-apoptotik Bax ve Bak tarafından tetiklenen mitokondriyal geçirgenliği ve bunu takiben hücre ölümünü inhibe eder (5). Çoğu kanser karşıtı ajan, dış mitokondriyal membran geçirgenliğini içeren mitokondriyal apoptotik yolağı tetikleyerek etki eder (3). Bu süreç Bcl-2 ailesinin pro- ve anti-apoptotik üyeleri tarafından kontrol edilir ve kaspaz aktivasyonuna yol açan sitokrom c' yi içeren mitokondriyal membranlar arası proteinlerin sitosolik serbestleşmesine neden olur (3). KML' de, Bcl-2' yi ve kaspaz yolağını hedef alan tedavi seçeneklerinin hücre proliferasyonu baskılayarak ve hücre apoptozunu arttırarak yararlı olabileceği gösterilmiştir (6-9). Apigenin, maydanoz, soğan, bazı baharatlar, portakal, çay, papatya, buğday filizi gibi sebze ve Yazım alanları gerektiği kadar uzatılabilir meyvelerde bolca bulunan, anti-proliferatif, anti-inflamatuvar ve anti-metastatik aktiviteye sahip, iyi tanımlanmamış bir flavondur (10,11). Apigenin, diğer yapısal ilişkili flavonoidlere göre tümör hücrelerine karşın normal hücreler üzerine çarpıcı etkileri nedeniyle ve düşük içsel toksisite nedeniyle yararlı ve sağlığı geliştirici olarak özellikle son yıllarda ilgi kazanmıştır (12). Apigenin' in; kaspaz-3, 8 ve 9 aracılığıyla apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (3,11,13). Ayrıca Apigenin tedavisi ile Bax/Bcl-2 oranı değişmekte apoptoza eğilim artmaktadır (10,12). Apigenin; meme, serviks, kolon, akciğer, over, prostat, cilt, tiroid, endometriyal, mide, karaciğer, adrenokortikal tümörler, nöroblastom ve bazı lösemi tiplerinde çalışılmıştır (10,12).

Ancak literatürde, kronik myeloid lösemide Apigenin ile yapılmış yeterli sayıda çalışma yoktur. Bu çalışmada, tümör hücrelerinin apoptozu üzerine güçlü etkisi olduğu bildirilen Apigenin' in, kronik myeloid lösemi hücreleri üzerinde de etkili olabileceği ve bu etkilerin kaspaz yolağı üzerinden olabileceği öngörülmektedir. Bununla ilgili olarak bu çalışmada, Apigenin' in imatinib duyarlı ve imatinib dirençli kronik myeloid lösemi kök hücreleri üzerine apoptotik etkileri incelenmiştir (13-14). Ancak, Apigeninin'in sitotoksik ve antiproliferatif etki ile hücre çoğalmasını azaltması beklenirken hücre çoğalması üzerinde belirli bir azalma gözlenememiştir aynı zamanda 48 saat boyunca Apigenin'in artan dozlarına maruz bırakılan KML kök hücrelerinin mitokondri zar potansiyeli bozulumlarında artış olması beklenirken elde edilen verilerde düzenli bir artış gözlenememiştir.

6.KAYNAKLAR

1 - Gencer EB, Ural AU, Avcu F, Baran Y. A novel mechanism of dasatinib- induced apoptosis in chronic myeloid leukemia; ceramide synthase and ceramide clearance genes. Ann Hematol 2011; 90:1265-1275.

2 - Kurosu T, Wu N, Oshikawa G, Kagechika H, Miura O. Enhancement of imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells by nutlin-3 through synergistic activation of the mitochondrial apoptotic pathway. Apoptosis 2010; 15:608-620.

3 - Iwasaki R, Ito K, Ishida T, Hamanoue M, Adachi S, Watanabe T, Sato Y. Catechin, green tea component, causes caspase-independent necrosis-like cell death in chronic myelogenous leukemia. Cancer Sci 2009; 100:349-356.

4 - Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. Clin Cancer Res 2009; 15:1126-1132.

5. Arisan ED, Kutuk O, Tezil T, Bodur C, Telci D, Basaga H. Small inhibitor of Bcl-2, HA14-1, selectively enhanced the apoptotic effect of cisplatin by modulating Bcl-2 family members in MDA-MB-231 breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat 2010; 119:271-281.

6-Pellicano F, Simara P, Sinclair A, Helgason GV, Copland M, Grant S, Holyoake TL. The MEK inhibitor PD184352 enhances BMS-214662- induced apoptosis in CD34+ CML stem/progenitor cells. Leukemia 2011; 25:1159-1167.

7 - Cheng ZY, Liang WT, Niu ZY, Xue F, Yao L, Pan L. [Effects of wild type PTEN gene on proliferation, apoptosis and the influence on apoptosis key factor Bcl-2 and Caspase family on K562 cells]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2009; 40:679-683.

8-Nica AF, Tsao CC, Watt JC, Jiffar T, Kurinna S, Jurasz P, Konopleva M, Andreeff M, Radomski MW, Ruvolo PP. Ceramide promotes apoptosis in chronic myelogenous leukemiaderived K562 cells by a mechanism involving caspase-8 and JNK. Cell Cycle 2008; 7:3362- 3370.

9-Czyz M, Jakubowska J, Sztiller-Sikorska M. STI571/doxorubicin concentration-dependent switch for diverse caspase actions in CML cell line K562. Biochem Pharmacol 2008; 75:1761- 1773.

10-Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention:progress, potential and promise. Int J Oncol 2007; 30:233-245.

11. Vargo MA, Voss OH, Poustka F, Cardounel AJ, Grotewold E, Doseff AI. Apigenininduced-apoptosis is mediated by the activation of PKCdelta and caspases in leukemia cells. Biochem Pharmacol 2006; 72:681-692.

12-Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. Pharm Res 2010; 27:962-978.

13. Lu HF, Chie YJ, Yang MS, Lee CS, Fu JJ, Yang JS, Tan TW, Wu SH, Ma YS, Ip SW, Chung JG. Apigenin induces caspase-dependent apoptosis in human lung cancer A549 cells through Bax- and Bcl-2- triggered mitochondrial pathway. Int J Oncol 2010; 36:1477-1484.

14-Goldman JM, Mughal TI. Chronic myelogenous leukemia. In: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD, Eds. Postgraduate Haematology. 5. Ed., Massachusetts: Blackell Publishing Ltd, 2005: 603-618.