Teobromin STI571'in Apoptotik Etkinliğini Artırır mı?

Does Theobromine Increase the Apoptotic Effect of STI571?

Yeşim Korkmaz Kasap[1], Zeynep Özdemir[2], Çağan Asparuk[2], Oğuzhan Ak[2], Dide Aysun[2], Doğa Akgör[2], Fulya Elmastaş[2] Doğukan Akkuş[2], Erkan Yurtcu[1]

[1]Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
[2]Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dönem 4 Öğrencisi, Ankara, Türkiye

ÖZET

Amaç: Tirozin kinaza özgü bir inhibitör olan STI571 KML kemoterapisinde kullanılır. Diğer kemoterapötik ajanlara benzer şekilde, bazı hastalarda ilaç direnci ve intoksikasyon sebebiyle sınırlı bir etkinliğe sahiptir. Bu yüzden, çoğu kanser hastası kemoterapötik ajanın etkinliğini artırmak için günlük ek gıdalar ve bitkisel ekstraktları kullanır. Kakaonun bir metaboliti olan teobromin prooksidan etkilere sahiptir ve hücre içi sinyal yolaklarını düzenler. Çalışmamızın amacı birlikte ve ayrı ayrı kullanıldığında STI571 ve teobrominin K562 hücreleri üzerinde potansiyel apoptotik etkilerini göstermektir.
Yöntem: STI571 ve teobrominin inhibitör konsantrasyonları MTT metoduyla belirlendi. Her iki ajan da hücrelere 48 saat süre ile tek başına ve birlikte olacak şekilde uygulandı. Kaspaz aktiviteleri kolorimetrik olarak belirlendi. Apoptoz ve nekroz akridin turuncusu/etidyum bromür boyaması ile değerlendirildi. $p<0,05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.
Bulgular: Kaspaz aktiviteleri her iki ajan tek başlarına uygulandığında artış gösterdi. Teobromin STI571'in kaspaz aktivitesini kaspaz tipine ve süreye bağımlı olarak artırdı ($p<0,05$). Apoptotik hücre oranları iki ajan bir arada kullanıldığında da uygulama süresine bağlı olarak arttı ($p<0,05$). Teobromin nekrotik hücre oranlarını azalttı.
Sonuç: Bu *in vitro* çalışma ile hücre içi sinyal yolaklarındaki etkisi henüz tam olarak anlaşılamamış olan teobrominin STI571 tarafından yürütülen apoptotik cevapta kaspazlar üzerinden etkili olduğu gösterilmiştir. Bu verilerin daha sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacağını düşünüyoruz.

Anahtar Sözcükler: STI571, teobromin, kaspaz, apoptozis, KML

ABSTRACT

Objective: STI571, a selective tyrosine kinase inhibitor is used in CML chemotherapy. It has limited effects in some cases due to drug resistance and intoxication as other chemotherapeutic agents. Thus, many cancer patients use dietary supplements and herbal extracts for increasing the effectiveness of chemotherapeutic agents. Theobromine, a metabolite of cacao has prooxidant effects and regulates intercellular signaling pathways. The aim of the study is to determine the potential apoptotic effects of STI571 and theobromine on K562 cells, when used alone and in combination.
Methods: Inhibitory concentrations of STI571 and theobromine were determined by MTT method. Both agents were applied to the cells at 48 h time period alone and in combination. Caspase activities were assessed colorimetrically. Apoptosis and necrosis were evaluated by using acridine orange/ethidium bromide staining. $p<0.05$ was considered as statistically significant.
Results: Caspase activities increased when both agents administrated alone. Theobromine increased effects of STI571 on caspase activities in time and type dependent manner ($p<0.05$). Apoptotic cell rates also increased when two agents applied in combination ($p<0.05$) in time dependent manner. Theobromine also reduced necrotic cell rates.
Conclusion: Although there are limited data about the intracellular effects of theobromine, we showed that theobromine has effects on the caspase pathway related apoptotic response carried out by STI571. We believe that this in vitro study will shed light for further researches.

Key Words: STI571, theobromine, caspase, apoptosis, CML

Geliş Tarihi: 03.08.2016 **Kabul Tarihi:** 11.08.2016

Received: 08.03.2016 **Accepted:** 08.11.2016

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: DA14/24) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr.Erkan Yurtcu, Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, Bağlıca, Etimesgut, Ankara
E-posta: erkanyurtcu@gmail.com
©Telif Hakkı 2016 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi - Makale metnine http://medicaljournal.gazi.edu.tr/ web adresinden ulaşılabilir.
©Copyright 2016 by Gazi University Medical Faculty - Available on-line at web site http://medicaljournal.gazi.edu.tr/
doi:http://dx.doi.org/10.12996/gmj.2016.60

GİRİŞ

Kronik miyeloid lösemi (KML), miyeloid öncül hücrelerin proliferasyonunda artış, apoptozunda azalma ile seyreden klonal neoplastik bir hastalıktır. Hastalığın moleküler patogenezinde (t9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyonuyla ortaya çıkan Philadelphia kromozomu rol oynar. Translokasyon sonucunda 9. kromozomda bulunan ve bir reseptör olmayan tirozin kinaz kodlayan *Abelson Leukemia Virus Viral Oncogen* (*ABL*) geninin 22. kromozomdaki serin/treonin kinaz özelliği olan *Breakpoint Cluster Region* (*BCR*) genine füzyonu gerçekleşir. Oluşan kimerik BCR-ABL proteini yüksek tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve hücre döngüsü, apoptoz, hücre adezyonu ve çeşitli sinyal yolakları üzerine etki ederek malign hücre transformasyonuna yol açar (1,2). BCR-ABL proteinin etki mekanizmasının anlaşılması bu proteini özgül olarak inhibe eden hedeflenmiş tedavi sağlayan moleküllerin geliştirilmesini sağlamıştır. ST1571 (imatinib mesilat), BMS-345825 (dasatinib) ve AMN107 (nilotinib) bu moleküller arasındadır. Hastaların %87'sinde sitogenetik yanıt sağlayan STI571, BCR-ABL kimerik proteinin ATP bağlanma bölgesine yarışmalı inhibisyon ile bağlanarak enzime ATP bağlanmasını engeller. Sonuçta füzyon proteini kinaz aktivitesinden yoksun kalır (3).

Günlük diyette sık olarak tüketilen çay, kahve, meyve ve sebzelerde bulunan kemopreventif fitokimyasallar son dönemde araştırmaların konusu olmuştur. Kakao (*Theobroma cacao L*) metabolitlerinden olan prosiyanidin ve pentoksifilin kuvvetli antioksidan etkinliğe sahiptir ve kanser hücrelerinde seçici olarak bölünmeyi engeller (4). Kakao tüketimi sonrası biyo-yararlanımı en yüksek fitokimyasal olan teobromin (3,7-dimethylxanthine) ise metilksantin grubuna ait antioksidan bir alkoloid olup aynı zamanda bir kafein (1,3,7-trimethylxanthine) metabolitidir. Elli gram siyah ve sütlü çikolatadaki miktarı sırasıyla 240-520 mg ve 65-160 mg'dır (5,6). Teobromin fosfodiesterazları inhibe ederek vazodilatör etki gösterir (7). Daha önceleri diüretik olarak kullanılan teobromin, ayrıca ateroskleroz, periferal damar hastalıkları, anjina pektoris ve hipertansiyon tedavisinde de kullanılmıştır (6).

Bu çalışmada amacımız KML tedavisinde kullanılan STI571'in potansiyel etkileri üzerine bir antioksidan alkoloid olan teobrominin katkısını *in vitro* koşullarda araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre kültürü

İnsan KML hücre dizisi K562 (CCL243, ATCC, Rockville, ABD) hücreleri %10 FBS (Biochrome, Almanya) içeren RPMI 1640 (Biochrome) besiyeri içinde 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatörde (Heracell 150i, Heraeus, Almanya) çoğaltıldı. Hücreler her 24 saatte bir pasajlandı ve çalışmada 5-7. pasajda hücreler kullanıldı. Çalışma öncesinde hücre canlılıkları tripan mavisi boya atma testi, hücre sayıları ise Thoma lamı ile sayılarak belirlendi. 6'lı kültür kabının her bir kuyucuğunda %98'i canlı en az 10^5 hücre olacak şekilde deneylere başlandı.

Sitotoksik ilaç/kimyasal dozlarının (IC50) belirlenmesi

STI571 (Novartis, İsviçre) ve teobrominin (Sigma-aldrich, Almanya) sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde kantitatif kolorimetrik bir yöntem olan MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide] hücre proliferasyon testi kullanıldı. IC50 değerlerinin belirlenmesinden sonra STI571 ve teobromin hücrelere ayrı ayrı ve birlikte olacak şekilde 24 ve 48 saatlik sürelerle uygulandı. Hiçbir uygulama yapılmayan hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı.

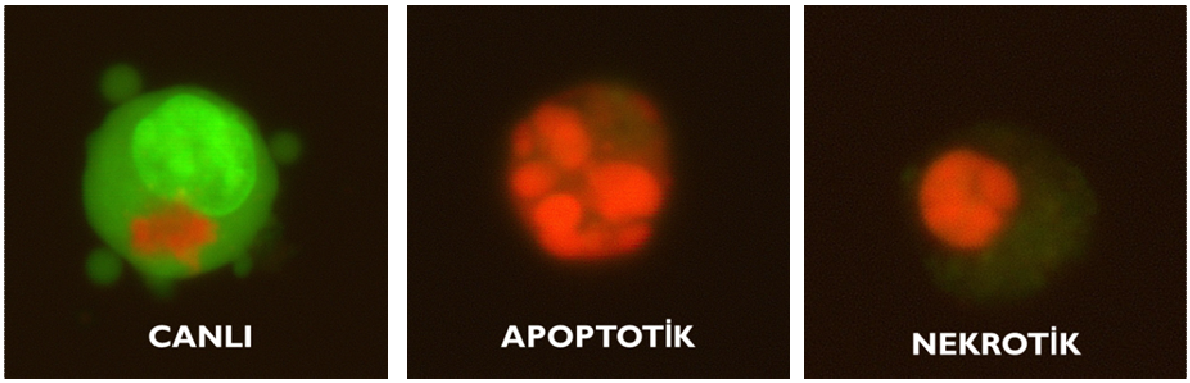
Kaspaz-3 ve kaspaz-8 düzeylerinin belirlenmesi

Kaspaz-3 ve -8 düzeyleri ticari kit (Enzo, ABD) yardımıyla kolorimetrik yöntemle belirlendi. 1-5 X 10^6 hücre kit içeriğinden çıkan lizis tamponu ile 10 dakika buz üstünde bekletildi. 10000 g santrifüj sonrasında süpernatandan protein düzeyi belirlendi. Kitin öngördüğü şekilde 10-200 µg protein içeren örneklerde özgül substratlar yardımıyla kaspaz-3 ve kaspaz-8 düzeyleri kat değişimi olarak belirlendi.

Hücrelerde apoptoz ve nekrozun belirlenmesi

Apoptotik ve nekrotik hücre oranları hücrelerin akridin turuncusu/etidyum bromür boyanma kalıplarına göre belirlendi. 0.1 mg/ml akridin turuncusu, 0,1 mg/ml etidyum bromür boya karışımından 1 µl, 9 µl hücre süspansiyonu (0,5X10^6 hücre/ml) ile karıştırıldı. Boyama sonrası her bir uygulama grubundan ve kontrol grubundan 500 hücre olacak şekilde floresan ataçmanlı mikroskopta (Leica DM3000, Almanya) sayım yapıldı (8).

Bu boyama kalıbına göre üç tip hücre ayırt edilebilir (Resim1).



Resim 1: Akridin turuncusu/etidyum bromür ile boyanmış hücreler. Canlı hücreler: bozulmamış yapıda, parlak yeşil çekirdekli, Apoptotik hücreler: kromatin kondanse olmuş, turuncudan kırmızıya değişen çekirdekli, Nekrotik hücreler: turuncudan kırmızıya değişen bozulmamış çekirdekli

İstatistiksel Analiz

24 ve 48 saatler arası bağımlı iki grup ortalamalarının karşılaştırılmaları Wilcoxon Testi ile gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis Testi ile yapıldı. Ardından çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Dunn Testi kullanıldı. $p<0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veri analizi SPSS 17.0 paket programı ile gerçekleştirildi.

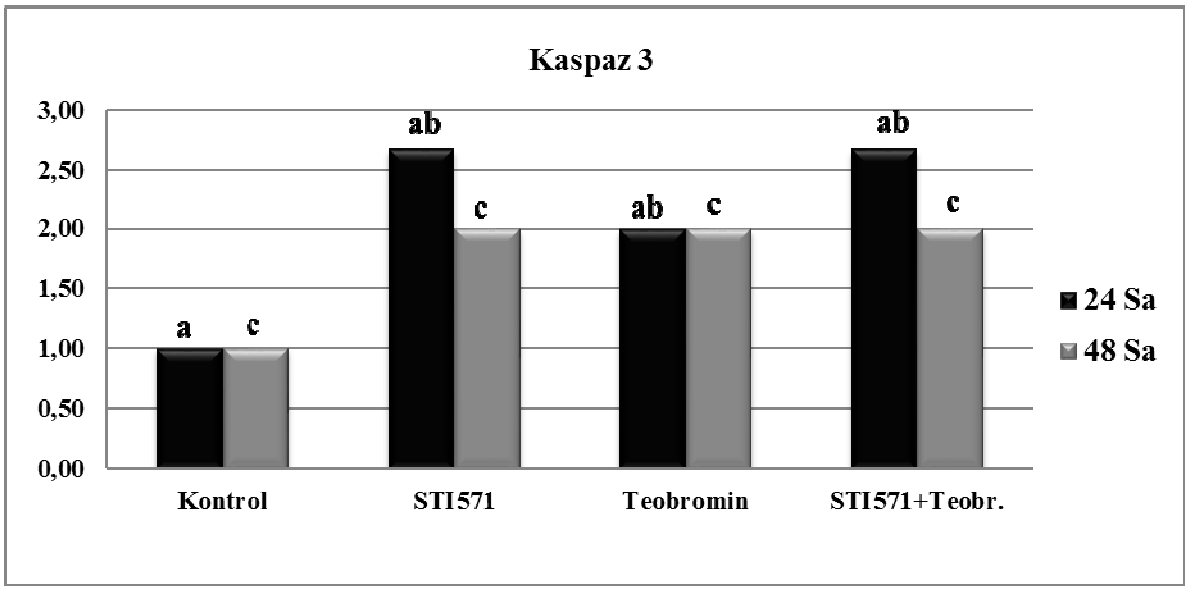
BULGULAR

IC50 değerleri

STI571 için IC50 dozu 24 saat için 128 µM, 48 saat için 209 µM olarak belirlendi. Teobromin için IC50 dozu 24 saat için 0,75 mM, 48 saat için 5,6 mM olarak belirlendi.

Kaspaz-3 aktivitesi

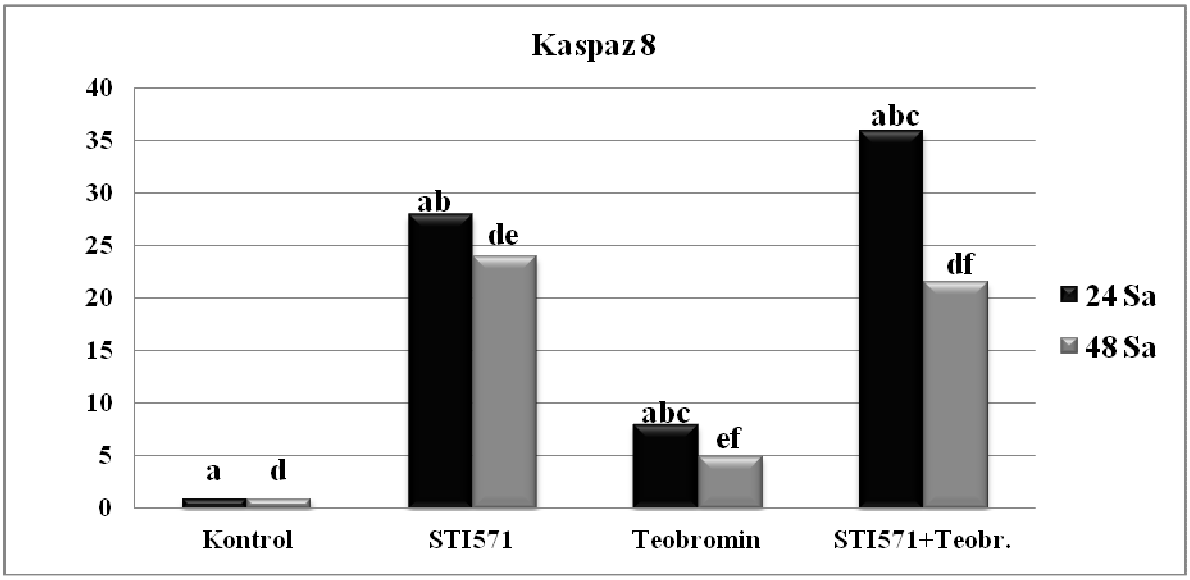
24 ve 48 saatlik uygulama sonucunda tüm uygulama gruplarında kaspaz-3 aktivitesinde görülen artışlar kontrol grubundan farklı idi ($p<0,05$). STI571'in tek başına 24 saat uygulanması ile elde edilen değer teobrominin tek başına uygulanması ile elde edilen değerden daha yüksekken ($p<0,05$) ikili uygulama ile elde edilen değere benzerdi ($p>0,05$). Uygulama süresi 48 saate ulaştığında hem ajanların tek tek uygulanması hem de bir arada uygulanması ile elde edilen değerler birbirleri ile benzerdi ($p>0,05$) (Resim 2).



Resim 2: Uygulamalara bağlı kat değişimi olarak Kaspaz 3 aktiviteleri
*Harfler istatiksel açıdan anlamlı fark olan grupları ifade etmektedir (p<0.05).

Kaspaz-8 aktivitesi

24 saatlik uygulama sonucunda tüm uygulama gruplarında kaspaz-8 aktivitesinde görülen artışlar kontrol grubundan farklı iken (p<0,05) 48 saatlik uygulamada sadece STI571 ve ikili uygulama sonucunda elde edilen değerler farklı idi (p<0,05). Her iki zaman periyodunda teobrominin tek başına uygulanmasıyla gözlenen aktivite artışı, tek başına STI571 ve ikili uygulama ile elde edilenden düşüktü (p<0,05). İkili uygulama ile elde edilen aktivite artışı 24 saat için her iki ajanın tek tek uygulanması ile elde edilen değerden yüksekken (p<0,05), 48 saatte STI571 ile benzerdi (p>0,05). 48 saat uygulama süresinde STI571'in tek başına uygulanması ile gözlenen kaspaz-8 aktivite artışı teobrominin tek başına uygulanması ile gözlenenden yüksekti (p<0.05) (Resim 3).



Resim 3: Uygulamalara bağlı kat değişimi olarak Kaspaz 8 aktiviteleri
*Harfler istatiksel açıdan anlamlı fark olan grupları ifade etmektedir (p<0.05).

Apoptotik ve nekrotik hücre oranları

24 ve 48 saatlik uygulama sonrasında STI571 ve teobrominin hem tek başlarına hem de birlikte kullanılması apoptotik hücre oranlarını kontrol grubuna göre artırdı (p<0.05). İki ajanın birlikte kullanılması ile elde edilen apoptotik hücre değerleri 24 saat süre periyodunda ajanların tek başlarına kullanılmasıyla elde edilenden anlamlı olarak yüksekken (p<0,05), 48 saatte benzerdi (p>0,05) (Tablo 1 ve 2).

24 ve 48 saatlik uygulama sonrasında STI571 ve STI571+teobromin uygulamasıyla elde edilen nekrotik hücre oranları kontrol grubuna göre yüksekken (p<0.05) teobrominin tek başına uygulaması elde edilen oranlar yüksek değildi (p>0.05). 24 saat uygulama sonrasında ikili uygulama ile elde edilen nekrotik hücre oranları STI571'in tek başına uygulaması ile elde edilen ile benzerken (p>0,05), 48 saat için daha düşüktü (p<0,05) (Tablo 1 ve 2).

Tablo 1: 24 saat uygulama sonrası apoptotik ve nekrotik hücre oranları

		Apoptotik (%±SD)	Nekrotik (%±SD)	Canlı (%±SD)
24 saat	**STI571**	22.67 (±3.79)[a.b.c]	8.0 (±2.0)[d]	69.33 (±2.08)[k.l]
	Teobromin	4.0 (±1.0)[a.b.c]	1.67 (±2.08)[e]	94.33 (±1.53)[k.l.m]
	STI571+Teobr.	32.33 (±6.81)[a.c]	8.33 (±5.51)[d.e]	59.33 (±9.45)[k.m]
	Kontrol	0.67 (±0.58)[a]	0.67 (±0.58)[d]	98.67 (±0.58)[k]

*Harfler istatiksel açıdan anlamlı fark olan grupları ifade etmektedir ($p<0.05$).

Tablo 2: 48 saat uygulama sonrası apoptotik ve nekrotik hücre oranları

		Apoptotik (%±SD)	Nekrotik (%±SD)	Canlı (%±SD)
48 saat	**STI571**	31.33 (±1.53)[p.r]	17.33 (±1.53)[t.u]	51.33 (±2.89)[x.y]
	Teobromin	1.67 (±1.53)[p.r.s]	1.33 (±0.58)[v]	97.0 (±2.65)[y.z]
	STI571+Teobr.	36.0 (±3.61)[p.s]	13.0 (±1.0)[t.u.v]	51.0 (±3.0)[x.z]
	Kontrol	1.0 (±1.0)[p]	0.33 (±0.58)[t]	98.67 (±1.15)[x]

*Harfler istatiksel açıdan anlamlı fark olan grupları ifade etmektedir ($p<0.05$).

TARTIŞMA

BCR-ABL aktivitesine özgü tirozin kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi KML tedavisinde hızlı değişimlere neden olmuştur. STI571 tedavisi hastaların klinik seyri, cevap oranları ve sağ kalımlarında daha önceki standartlara göre daha iyi sonuçlar alınmasını sağlamıştır. Bu gelişmelere rağmen direnç ve intolerans sebebiyle tüm hastalar STI571 tedavisinden fayda görememektedir. STI571 tedavisi alan hastaların yaklaşık olarak 1/3'ü yetersiz cevap ve intoksikasyon sebebiyle tedavilerine devam edememektedir (9).

Popülasyon çalışmaları düzenli olarak sebze, meyve, çay, soya fasulyesi gibi antioksidan içeren gıdaları tüketenlerde kanser sıklığının daha düşük olduğunu göstermiştir. Kakao ve çikolata tüketimi de içerdikleri yüksek antioksidan aktiviteleri sebebiyle kansere yol açan karmaşık yolakların engellenmesinde rol oynar. Üstelik antioksidanlar redoks potansiyel dengesizliği olan kanser hücrelerinde prooksidan etki de göstererek hücre döngüsü, apoptoz ve sinyal yolakları üzerine etki ederler (10).

Çalışmamızda KML tedavisinde kullanılan STI571 ve antioksidan özellikleri bilinen teobrominin tek başlarına ve birlikte kullanıldığında ortaya çıkan etkileri değerlendirildi. Sonuçlarımıza göre STI571 daha önceki çalışmalarda da (11,12) gösterildiği gibi kaspaz 3 ve 8 aktivitelerini artırmıştır. Teobromin, STI571'in kaspaz 8 aktivite artışına süre bağımlı olarak katkı sunarken kaspaz 3 aktivite artırıcı etkisine anlamlı bir katkı sunmamıştır (Resim 2 ve 3). Metaboliti teobromin olan fitokimyasallara bağlı apoptozis uyarısında kaspaz yolağı her zaman aktive olmaz (13). Ancak bizim çalışmamızda en azından kaspaz 8 aktivite artışında ikili uygulamanın daha etkili olduğu görülmüştür. Kaspaz 8 başlatıcı kaspazlar sınıfının üyesidir ve aktifleştiğinde içerisinde kaspaz 3'ün de bulunduğu etken kaspazları aktive eder. Deney setimizde ikili uygulama ile kaspaz 8 aktivite artışı sağlanmasına rağmen kaspaz 3 aktivite artışı sağlanmaması diğer etken kaspazların aktive olduğunu akla getirmektedir. Bu yüzden, daha sonra yapılacak çalışmalarda diğer kaspaz aktivite artışlarının da değerlendirilmesi teobrominin potansiyelinin açığa çıkarılması için önemli olacaktır.

Kaspaz aktivite artışının sonucuna bağlı olarak her iki ajan da apoptotik hücre oranlarında artışlar sağlamıştır. 24 saat sürelik ikili uygulamada, kaspaz 8 aktivite artışına paralel şekilde apoptotik hücre oranları da artmıştır. Uygulama süresinin uzamasıyla ikili uygulamanın apoptoz oranlarına etkisi kaspaz 8 sonuçlarına paralellik gösterecek şekilde artmamıştır. STI571, hücre tipine göre TNF bağımlı ya da bağımsız olacak şekilde farklı tipte kaspazları aktive ederek apoptozisi uyarır (11,12). Daha önce yapılan çalışmalarla kakao metabolitleri olan kateşinler, pentoksifilin, prosiyanidin ve fenoliklerin bazı hayvan modelleri ve kanser hücrelerinde farklı kaspaz seviyelerini artırdığı (13,14) ve bunu da TNFα ve buna bağlı hücre içi sinyal yolaklarının (MAPK) yanı sıra siklinler, p21 ve p27 üzerinden yaptığı belirlenmiştir (10). Teobromin MAPK, Akt/mTOR ve NFκB yolağını baskılayıp p38 ve JNK aktivitesini artırarak hücre büyümesini engeller.

Bu veriler deney setimizde elde ettiğimiz sonuçların moleküler temellerini açıklar niteliktedir ve diğer kakao metabolitleri gibi teobrominin de apoptoz üzerine etkili olduğunu göstermektedir. Kaspaz ve apoptoz sonuçlarımıza göre teobromin KML hücreleri üzerinde apoptotik etkinliğe sahiptir ve bunu da kaspaz tipine ve uygulama süresine bağımlı olacak şekilde gerçekleştirmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarını değerlendirdiğimizde göze çarpan bir diğer önemli bulgu ise nekrotik hücre oranlarına ilişkin verilerdir (Tablo 1 ve 2). Teobromin tek başına uygulandığı her iki zaman periyodunda da nekrotik hücre oranlarında anlamlı bir artışa neden olmamıştır. Üstelik uygulama süresi 48 saate ulaştığında STI571'in tek başına uygulaması ile elde edilen oranlardan daha az nekrotik hücre oranına ulaşılmıştır. Bu veri apoptotik hücre oranları ile birlikte değerlendirildiğinde deney setimizde teobrominin nekroza yönelen hücreleri apoptoza yönlendirildiğini göstermektedir. Ancak bu konuda daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda bazı bitki alkoloidlerinin STI571'in etkinliğini hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda artırdığı gösterilmiştir (16-19). Biz de bu çalışma ile hücre içi sinyal yolaklarındaki etkisi henüz tam olarak anlaşılamamış olan teobrominin STI571 tarafından yürütülen apoptotik cevapta kaspazlar üzerinden etkili olduğuna dair *in vitro* kanıtlar elde ettik. Bu ön çalışma ile elde edilmiş olan verilerin yapılacak daha ileri çalışmalara ışık tutacağını ve oldukça sık tüketilen kakao ve çikolata gibi gıdaların anti kanser ajanların etkinliğinin artırılmasına yönelik çalışmalara ışık tutabileceğini düşünmekteyiz.

Çıkar Çatışması
Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Nowell PC. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. J Clin Invest. 2007; 117:2033-5
2. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000 96:3343-56
3. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. European LeukemiaNet. Lancet 2007; 28;370:342-50
4. Latif R. Chocolate/cocoa and human health: a review. Neth J Med. 2013;71:63-8
5. Smit HJ and Blackburn RJ. Reinforcing effects of caffeine and theobromine as found in chocolate. Psychopharmacology (Berl) 2005; 181:101-6
6. Smit HJ, Gaffan EA, Rogers PJ, Methylxanthines are the psycho-pharmacologically active constituents of chocolate. Psychopharmacology (Berl) 2004; 176:412–9
7. Kamphuis J, Smits P, Thien T. Vascular effects of pentoxifylline in humans. J Cardiovasc Pharmacol. 1994; 24:648-54

8. Baskić D, Popović S, Ristić P, Arsenijević NN. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. Cell Biol Int. 2006; 30:924-32

9. Morozova EV, Vlasova YY, Pryanishnikova MV, Lepik KV, Afanasyev BV. Efficacy of Dasatinib in a CML Patient in Blast Crisis with F317L Mutation: A Case Report and Literature Review. Biomark Insights. 2015; 8:10 (Suppl 3):43-7. doi: 10.4137/BMI.S22438

10. Kim J, Kim J, Shim J, Lee CY, Lee KW, Lee HJ. Cocoa phytochemicals: recent advances in molecular mechanisms on health. Crit Rev Food Sci Nutr. 2014;54:1458-72.

11. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell. 2003;114:181–90

12. Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM. Life and death decisions: Secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. Immunity. 2004;21:461–5.

13. Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, Barbisan F, Dornelles EB, Glanzner W, et al. Guaraná a richest caffeine food increase oxaliplatin sensitivity of colorectal HT-29 cells by apoptosis pathway modulation. Anticancer Agents Med Chem. 2015 DOI: 10.2174/1871520616666151217121138

14. Marques GM, Rasslan R, Belon AR, Carvalho JG, Felice Neto R, Rasslan S, et al. Pentoxifylline associated to hypertonic saline solution attenuates inflammatory process and apoptosis after intestinal ischemia/reperfusion in rats. Acta Cir Bras. 2014; 29:735-41.

15. Sugimoto N, Miwa S, Hitomi Y, Nakamura H, Tsuchiya H, Yachie A. Theobromine, the primary methylxanthine found in Theobroma cacao, prevents malignant glioblastoma proliferation by negatively regulating phosphodiesterase-4, extracellular signal-regulated kinase, Akt/mammalian target of rapamycin kinase, and nuclear factor-kappa B. Nutr Cancer. 2014; 66:419-23.

16. Zhu J, Ding B, Li Y. Long-term effect of interferon-α combined with homoharringtonine on chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Leuk Lymphoma. 2013; 54:1426-9.

17. Huang BT, Zeng QC, Zhao WH, Tan Y. Homoharringtonine contributes to imatinib sensitivity by blocking the EphB4/RhoA pathway in chronic myeloid leukemia cell lines. Med Oncol. 2014; 31:836.

18. Xu XH, Gan YC, Xu GB, Chen T, Zhou H, Tang JF, et al. Tetrandrine citrate eliminates imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells in vitro and in vivo by inhibiting Bcr-Abl/β-catenin axis. J Zhejiang Univ Sci B. 2012; 13:867-74.

19. Yan-lin Wei, Lei Xu, Yun Liang, Xiao-hua Xu, Xiao-ying Zhao. Berbamine exhibits potent antitumor effects on imatinib-resistant CML cells in vitro and in vivo Acta Pharmacologica Sinica 2009; 30: 451–7.