

HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI BAX, BCL-2, DAN RASIO BAX/BCL-2 DENGAN RESPONS KEMOTERAPI FASE INDUKSI PADA LEUKEMIA MIELOID AKUT ANAK

Eka Sari Supraptiningsih^{*✉}, Susanto Nugroho^{**}, Endang Sri Wahyuni^{***}

Abstrak

Leukemia mieloid akut merupakan keganasan terbanyak pada anak. Pengobatan utama leukemia anak adalah kemoterapi. Target obat kemoterapi adalah kematian sel terprogram atau apoptosis. Apoptosis pada kemoterapi merupakan apoptosis jalur intrinsik yang dikendalikan oleh famili *b cell lymphoma-2* pada membran mitokondria yang terdiri dari agen proapoptosis dan antiapoptosis. Sebagai agen proapoptosis adalah protein Bax dan agen antiapoptosis adalah protein Bcl-2. Adanya ketidakseimbangan pro dan antiapoptosis mempengaruhi prognosis terapi. Penelitian ini ingin mengetahui hubungan ekspresi Bax dan Bcl-2 maupun rasio Bax/Bcl 2 terhadap respons kemoterapi yaitu hasil *bone marrow puncture* (BMP) yang dijadikan marker prognosis setelah subjek mendapat kemoterapi fase induksi dalam 12 minggu pengobatan. Desain penelitian adalah *experimental pre-post test*, subjek merupakan pasien leukemia mieloid akut yang mendapat pengobatan kemoterapi fase induksi di RS.Dr.Saiful Anwar Malang menggunakan protokol kemoterapi revisi 2015 dengan rentang usia 1-14 tahun selama periode bulan Mei-September 2018. Hasil menunjukkan hubungan terbalik yang tidak signifikan antara peningkatan Bax dengan hasil BMP, semakin tinggi Bax menunjukkan hasil BMP tidak remisi ($p = 0,893$). Ekspresi Bcl-2 dengan hasil BMP menunjukkan hubungan tidak signifikan dengan korelasi negatif, semakin tinggi Bcl-2 pasca kemoterapi menunjukkan hasil BMP tidak remisi ($p = 0,586$), sedangkan rasio Bax/Bcl-2 setelah kemoterapi berbeda tidak signifikan ($p = 0,594$), dan hubungan rasio Bax/Bcl-2 dengan hasil BMP adalah tidak signifikan dengan korelasi positif semakin tinggi rasio semakin tidak remisi ($p = 0,104$). Kesimpulannya, peningkatan Bax tidak berhubungan signifikan dengan hasil respons kemoterapi fase induksi, penurunan Bcl-2 berhubungan tidak signifikan dengan respons kemoterapi fase induksi, hubungan tidak signifikan antara rasio Bax/Bcl2 dengan hasil BMP

Kata kunci : Bax, Bcl-2, kemoterapi, BMP, leukemia anak.

CORRELATION OF BAX, BCL-2, AND BAX/BCL-2 RATIO TO THE RESPONSE OF INDUCTION CHEMOTHERAPY IN CHILDREN WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Abstract

Acute myeloid leukemia is the most malignancy in children. The main treatment for childhood leukemia is chemotherapy. The target of chemotherapy drugs is programmed cell death or apoptosis. Apoptosis can occur through intrinsic pathway controlled by the family of *b cell lymphoma 2* in the mitochondrial membrane comprised of proapoptosis and antiapoptotic agents. The proapoptotic agent is Bax protein and the antiapoptotic agent is Bcl-2. The imbalance of proapoptotic and antiapoptotic agents will affect the prognosis. This study aimed to determine the correlation of Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl 2 ratio to chemotherapy response in bone marrow puncture (BMP) which was used as a prognosis marker after the subjects received the induction phase of chemotherapy in 12 weeks. This was an experimental research with pretest and post-test design. The subject was acute myeloid leukemia patients who received the induction phase chemotherapy at Dr. Saiful Anwar Hospital in Malang using the 2015 revised chemotherapy protocol during May-September 2018 and aged 1-14 years. The result showed a non-significant inverse relationship between Bax expression increase and BMP outcome, the higher Bax expression the BMP outcome does not remission ($p = 0.893$). The Bcl-2 expression and BMP showed no significant relationship with a negative correlation, the higher Bcl-2 after chemotherapy the BMP outcome does not remission ($p = 0.586$), however the Bax/Bcl2 ratio after chemotherapy was not significant ($p = 0.594$), and its correlation with BMP outcome was not significant with a positive correlation, the higher the the BMP outcome does not remission ($p = 0.104$). In conclusion, the increase in Bax was not significantly related to the results of the induction phase of chemotherapy response, the decrease in Bcl-2 was not significantly related to the induction phase of chemotherapy response, the relationship was not significant between the Bax/Bcl2 ratio with the BMP results.

Keywords: Bax, Bcl-2, BMP, chemotherapy, childhood leukemia.

* Program Magister (S2) Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

** Departemen Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya-RS. Dr. Saiful Anwar, Malang

*** Departemen Ilmu Faal, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

✉ E-mail: ekasari_pary@yahoo.co.id

Pendahuluan

Leukemia mieloid akut adalah penyakit heterogen yang menyumbang sekitar 20% dari keganasan pada anak dan remaja. Pengobatan utama leukemia anak adalah dengan kemoterapi. Meskipun target terapi masih terbatas untuk sebagian besar subtipe. Sebelum penemuan kemoterapi, rata-rata usia harapan hidup leukemia hanya 3 bulan.¹

Target obat kemoterapi adalah kematian sel atau disebut apoptosis. Apoptosis merupakan proses kematian sel terprogram, dengan tujuan untuk menjaga keseimbangan perkembangan sel-sel tubuh. Pada sel kanker yang ganas pertumbuhan sel lebih cepat dari kematian sel yang dipengaruhi oleh agen proapoptosis dan agen antiapoptosis melalui jalur intrinsik apoptosis. Famili Bcl-2 merupakan regulator pusat jalur intrinsik mitokondria yang mempunyai efek sitoprotektif terhadap apoptosis dan merupakan target dari obat kemoterapi. Molekul Bax terdapat pada membran luar mitokondria berfungsi sebagai molekul apoptosis yang akan menginduksi sitokrom c, kemudian sitokrom c berikatan dengan Apaf-1, ATP, dan caspase-9 yang akan mengaktifkan procaspase-3 menjadi caspase-3 yang akan memotong sitoskeleton.²

Hasil penelitian menunjukkan rasio Bcl-2/Bax berkorelasi negatif terhadap luaran pasien leukemia leukoblastik kronik pasca pemberian kemoterapi ($p = 0,04$) dan dapat dijadikan sebagai marker prognosis terapi. Pada berbagai penelitian ekspresi protein Bcl-2 dapat digunakan sebagai faktor prognosis untuk menilai respons kemoterapi. Mayoritas agen kemoterapi bekerja melalui inisiasi kerusakan DNA pada sel kanker, sehingga memicu protein p 53 yang nantinya akan menginduksi apoptosis sel kanker itu sendiri melalui kaskade yang melibatkan Bax dan inhibitor protein Bcl-2.^{3,4,5,6} Sampai saat ini belum pernah dilaporkan penelitian rasio Bax/Bcl-2 sebagai salah satu marker prognosis terhadap luaran klinis leukemia mieloid akut

pada anak yang telah mendapatkan kemoterapi fase induksi.⁷

Bahan dan Metode

Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan desain *experimental pre-post test*. Penelitian dilakukan di bangsal anak RS. Dr. Saiful Anwar Malang dan Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini telah disetujui oleh Tim Etik Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang dengan nomor surat 400/186/K.3/302/2017.

Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian yaitu pasien anak yang terdiagnosis leukemia mieloid akut yang menjalani kemoterapi fase induksi dengan protokol LMA revisi 2015 dengan rentang usia 1-14 tahun dan telah menyetujui *informed consent*. Periode penelitian pada bulan Mei-September 2018. Kriteria eksklusi yaitu penderita putus obat selama fase induksi kemoterapi, didapatkan penyakit autoimun seperti SLE, myasthenia gravis. Jumlah sampel penelitian adalah 9 anak.

Pemeriksaan Ekspresi Bax, Bcl-2 dan Rasio Bax/Bcl-2 dengan Flow Cytometry

Bahan pemeriksaan berupa sampel darah sebanyak 3 cc sebelum dan sesudah dilakukan kemoterapi fase induksi. Kemudian, dilakukan isolasi PBMC menggunakan *ficoll hypaque density gradient centrifugation*. Sampel pellet digunakan untuk pemeriksaan flowcytometry guna mengetahui ekspresi Bax, Bcl-2 dan rasio Bax/Bcl-2. Pada sampel pellet ditambahkan *cell staining buffer*, disentrifus, ditambahkan *fixation buffer* dan dicuci dengan *permeabilization wash buffer*. Selanjutnya dilakukan *staining* dengan antibodi Bax berlabel FITC (katalog number sc7272 FITC, Santacruz) dan PE *anti-human Bcl-2 antibody* (katalog number IC6472P, RnD systems).

Prosedur flowcytometry dilakukan sesuai dengan protokol pabrik. Data ekspresi Bax dan Bcl-2 diperoleh menggunakan BD FACSCalibur analyzer. Data dianalisis menggunakan software BD Cell Quest Pro.

Pada sampel juga diambil *bone marrow puncture* (BMP) setelah kemoterapi fase induksi sesuai protokol kemoterapi LMA anak revisi 2015. Parameter BMP yang digunakan adalah remisi komplit (jumlah sel blas < 5%), remisi parsial (jumlah sel blas 5-20%), dan tidak remisi (jumlah sel blas > 20%).

Analisis statistik

Data dikumpulkan dari hasil pengukuran *flow cytometry* berupa persentasi kadar Bax, Bcl-2 dan rasio Bax/Bcl-2, dilakukan uji normalitas data, uji beda antara rasio Bax/Bcl-2 sebelum dan sesudah kemoterapi. Kemudian dilakukan analisis hubungan antara Bax, Bcl-2 dan rasio Bax/Bcl-2 dengan hasil BMP pasca kemoterapi.

Hasil

Pada penelitian ini terdapat 3 variabel karakteristik subjek yaitu jenis kelamin, usia, dan jenis leukemia sesuai dengan gambaran apusan darah. Jumlah laki-laki sebanyak 55,5%, sedangkan perempuan sebanyak 44,5% dengan dominansi usia 1-5 tahun. Karakteristik subjek ditampilkan pada Tabel 1.

Ekspresi Bax dan Bcl-2 pada Sampel Darah

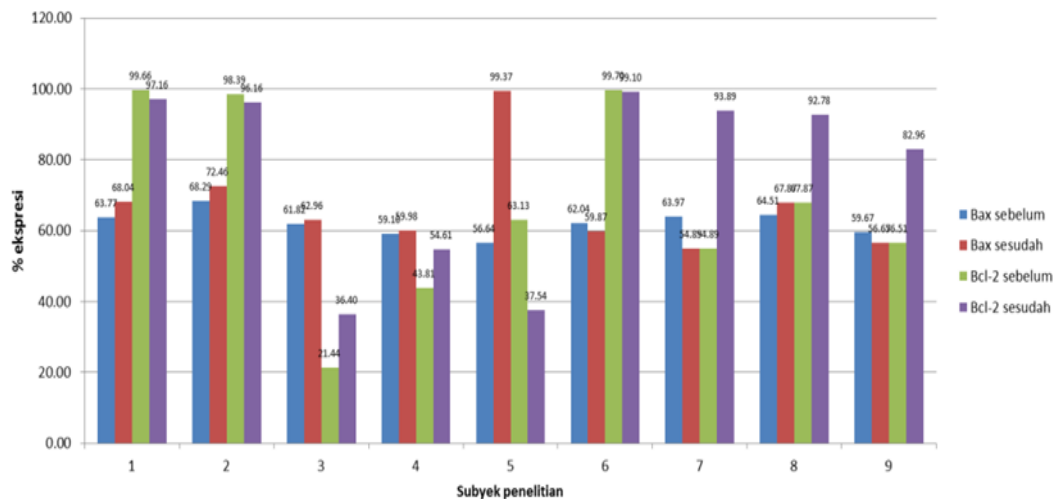
Hasil penelitian mendapatkan 6 subjek menunjukkan peningkatan ekspresi Bax, sedangkan 3 subjek mengalami penurunan ekspresi Bax. Ekspresi Bcl-2 juga terlihat menurun pada 3 subjek setelah dilakukan kemoterapi fase induksi, namun meningkat pada 6 subjek (Gambar 1). Korelasi antara Bax dan Bcl-2 kemudian dianalisis dengan hasil BMP. Pengukuran rasio Bax/Bcl2 pada pasien dengan uji beda wilcoxon menunjukkan adanya perbedaan tetapi tidak signifikan ($p = 0,594$). Pada Gambar 2 terlihat adanya kenaikan ekspresi Bax/Bcl-2 yang tidak signifikan.

Hubungan Bax, Bcl-2 dengan Hasil BMP Pasca Kemoterapi Fase Induksi

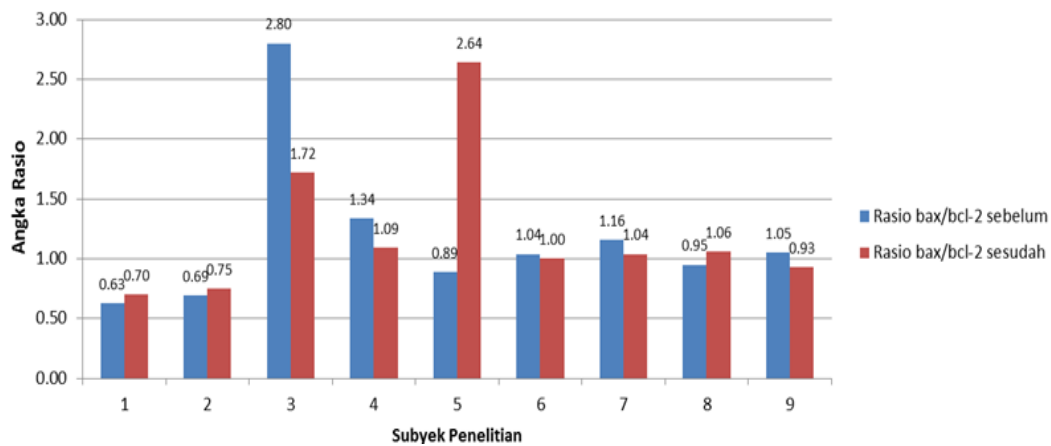
Perbedaan ekspresi Bax, Bcl-2 dan rasio Bax/Bcl-2 sebelum dan sesudah kemoterapi dianalisis hubungannya dengan hasil *bone marrow puncture* (BMP) menggunakan uji korelasi Spearman. Hasil menunjukkan hubungan yang tidak signifikan antara Bax, Bcl-2 terhadap hasil BMP dengan hubungan yang terbalik, sehingga semakin tinggi Bax menghasilkan hasil BMP tidak remisi ($p = 0,893$) dan semakin tinggi Bcl-2 menghasilkan hasil BMP tidak remisi ($p = 0,586$). Sementara rasio Bax/Bcl-2 menunjukkan hubungan tidak signifikan antara rasio Bax/Bcl2 dengan hasil BMP (Tabel 2). Semakin tinggi rasio Bax/Bcl-2

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian.

Kriteria	Total Subjek (n= 9)
Jenis kelamin	
Laki- laki	5
Perempuan	4
Usia (tahun)	
1-5	5
5-10	2
10-14	2
Tipe LMA	
LMA M3	1
LMA M4	5
LMA M5	3



Gambar 1. Ekspresi Bax dan Bcl-2 sebelum dan sesudah kemoterapi fase induksi.



Gambar 2. Rasio bax/bcl-2 sebelum dan sesudah kemoterapi fase induksi

Tabel 2. Rasio Bax/Bcl-2 dan hasil BMP pasien setelah kemoterapi fase induksi.

Variabel	Hasil BMP			Total	r	p
	Tidak Remisi	Remisi Parsial	Remisi Komplet			
Rasio Bax/Bcl-2 rendah	2	1	0	3	0,577	0,104
Rasio Bax/Bcl-2 tinggi	1	2	3	6		
Total	3	3	3	9		

Pembahasan

Usia rerata pasien leukemia mieloid akut di RS. Dr. Saiful Anwar selama bulan Juni hingga September 2018 adalah 6 tahun dengan usia termuda 2 tahun dan usia tertua 14 tahun. Data ini sesuai dengan hasil penelitian di Amerika yang menunjukkan angka LMA di bawah 15 tahun dengan insiden 7/1.000.000 anak.⁸ Pada penelitian ini

didapatkan jenis kelamin laki-laki sebanyak 5 orang dan perempuan sebanyak 4 orang. Prognosis jenis kelamin laki-laki lebih buruk dibandingkan jenis kelamin perempuan.⁹ Pada penelitian ini didapatkan 3 jenis LMA yaitu LMA M3, LMA M4, LMA M5. Setelah dilakukan kemoterapi fase induksi yang mengalami remisi komplet sebanyak 3 subjek, 2 subjek merupakan pasien dengan LMA M4 dan satu pasien dengan LMA M5.

Prognosis LMA juga ditentukan oleh klasifikasi LMA. Penelitian di Jepang menunjukkan jenis LMA M4 (mielomonositik akut) dan LMA M5 (monositik akut) menunjukkan angka prognosis yang buruk karena terdapat FLT3/ITD positif pada jenis LMA tersebut.¹⁰

Terdapat lima subjek mempunyai rasio Bax/Bcl-2 lebih dari 1 yang berarti kadar Bax lebih tinggi dari kadar Bcl-2. Namun, ada 4 subjek mempunyai rasio Bax lebih rendah dari Bcl-2. Pada penelitian ini kadar ekspresi Bax mewakili agen proapoptosis, sedangkan Bcl-2 merupakan agen antiapoptosis. Fisiologi apoptosis tidak hanya memberi pengaruh terhadap sensitivitas kemoterapi tetapi juga aktifitas keganasan sel (*malignancy*).¹¹ Pada penelitian sebelumnya Bax dapat dijadikan faktor prognosis pada pasien LMA dewasa, disebabkan kenaikan Bax berkorelasi positif terhadap remisi komplet menggunakan 25 subjek penelitian, dengan hasil 15 pasien (71,4 %) memiliki ekspresi Bax tinggi dan remisi komplet, 6 pasien dengan Bax rendah, dan 4 pasien dengan Bax rendah remisi parsial dan tidak mengalami remisi memiliki luaran prognosis yang buruk. Namun, hasil penelitian lain menyebutkan kadar Bax tidak berkorelasi dengan remisi komplet pada penelitian dengan subjek 112 pasien LMA berusia 1- 59 tahun dengan rerata usia 16 tahun di New Delhi.¹² Nilai rerata variabel Bax mengalami peningkatan namun nilainya tidak signifikan setelah dilakukan analisis data. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sharawat, kadar Bax yang tidak tinggi pada subjek LMA dipengaruhi usia sampel. Penelitian tersebut didominasi oleh usia di bawah 15 tahun, penelitian lain mengatakan hasil yang berbeda karena subjek penelitian didominasi subjek yang berumur di atas 60 tahun.¹² Aktifitas Bax yang rendah dapat disebabkan oleh penghambatan keluarga Bcl-2 yang bersifat antiapoptosis seperti Bcl-2, Bcl-xl, dan Bcl-w. Obat 6 thioguanin sebagai salah satu regimen dalam kemoterapi fase induksi mempunyai cara kerja mempengaruhi

kadar Bax dan Bcl-2.¹³ Peningkatan kadar Bax setelah kemoterapi yang tidak signifikan dapat terjadi jika subjek yang terdiagnosis LMA menjalani kemoterapi fase induksi yang kedua yang sesuai dengan teori bahwa rendahnya Bax mempengaruhi remisi pasca kemoterapi fase induksi.

Protein Bcl-2 dan famili Bcl-2 merupakan regulator kunci dalam proses apoptosis. Hasil penelitian di Rumah Sakit Kyungpook, Korea pada 99 pasien LMA didapatkan ekspresi Bcl-2 yang tinggi sebesar 84% pada saat awal diagnosis, dan 95% ditemukan pada kasus LMA dengan kasus *relaps*. Subjek penelitian menggunakan usia rentang 15-48 tahun penderita LMA. Tingginya persentasi ekspresi Bcl-2 pada LMA berhubungan dengan adanya kemoresistensi pada saat fase induksi kemoterapi, serta adanya penurunan sel/mielosupresi saat kemoterapi. Protein Bcl-2 dianggap sebagai marker untuk prognosis, semakin tinggi Bcl-2 maka semakin buruk prognosis pada subjek pasien dengan LMA.¹⁴ Hasil penelitian *in vitro* menunjukkan protein Bcl-2 yang stabil menurunkan apoptosis sel T dan mempertahankan survival sel darah perifer dan sel yang mengalami malignansi.¹⁵

Pada penelitian ini digunakan regimen terapi doxorubicin dan sitarabin yang bekerja menurunkan ekspresi Bcl-2. Tingginya level Bcl-2 memungkinkan adanya resistensi. Selain itu, pada pasien LMA jangka waktu terapi mempengaruhi kadar Bcl-2, karena umumnya pasien memerlukan transfusi komponen darah sebelum dilakukan kemoterapi. Pada penelitian ini didapatkan 4 subjek mengalami peningkatan rasio Bax/Bcl-2, menunjukkan jumlah ekspresi protein proapoptosis (Bax) lebih tinggi dibandingkan dengan protein antiapoptosis (Bcl-2).

Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan rata-rata kadar rasio Bax/Bcl-2 mengalami peningkatan.

Peningkatan rasio menunjukkan jumlah Bax sebagai agen proapoptosis lebih dominan daripada Bcl-2 yang merupakan agen anti apoptosis. Adanya peningkatan rasio Bax/Bcl-2 merupakan faktor prognosis yang baik.¹⁶ Dalam suatu penelitian yang dilakukan oleh Poeta *et al* disebutkan kadar rasio Bax/Bcl-2 yang rendah berkorelasi dengan risiko sitogenetik yang buruk, hasil lain remisi komplet didapatkan pada tingginya rasio Bax/Bcl-2 ($p = 0,001$), namun korelasi Bax/Bcl-2 terhadap prediksi prognosis hanya dapat terjadi jika subjek penelitian mempunyai sitogenetik yang normal.¹⁶ Penelitian oleh Narayan *et al* tahun 2006 menunjukkan ketidakmaturation sel dalam *imunotyping* juga mempengaruhi tingginya kadar Bax/Bcl-2, rasio Bax/Bcl-2 tidak dipengaruhi oleh *onset* usia, klasifikasi FAB, klinis dan jumlah sel blas pada sumsum tulang.¹⁷

Pada penelitian ini diperoleh hubungan yang tidak signifikan antara peningkatan Bcl-2 dengan hasil BMP dengan hubungan yang negatif yaitu semakin tinggi Bcl-2 akan menghasilkan BMP tidak remisi. Penelitian sebelumnya, ekspresi Bcl-2 tidak berkorelasi terhadap luaran pasien LMA anak pada 22 subjek penelitian setelah diberikan kemoterapi fase induksi, sehingga ekspresi Bcl-2 yang berdiri sendiri tidak dapat digunakan untuk meramalkan faktor prognosis pada pasien LMA. Penelitian di Karachi dengan menggunakan 90 subjek pasien LMA yang diberikan sitarabin dan daunorubicin, pemeriksaan Bax dan Bcl-2 diambil dari darah perifer dan darah dari sumsum tulang, menunjukkan rasio Bax/Bcl-2 berkorelasi negatif terhadap luaran pasien. Semakin tinggi rasio Bax/Bcl-2 maka prognosis buruk ($p = 0.07$), sehingga pengaruhnya tidak signifikan.¹⁷ Pada penelitian ini pengambilan BMP pada subjek penelitian membutuhkan waktu yang bervariasi, sehingga kemoterapi fase induksi

tidak berjalan sesuai waktu yakni 12 minggu. Hal ini karena subjek dengan LMA membutuhkan koreksi penambahan sel darah merah dan trombosit sebelum dilakukan kemoterapi, sehingga berpengaruh dengan waktu pemberian kemoterapi. Respons terapi pertama menggunakan sitogenetik dan molekuler genetik merupakan 2 indikator luaran yang terbaik. Penurunan sel blast pada hari ke-15 dan ke-28 setelah fase induksi memiliki nilai prediktif yang kuat.⁸ Pada penelitian ini, morfologi sumsum tulang diperiksa pada akhir minggu ke-12 atau lebih, tergantung kemampuan subjek dalam menyelesaikan tahapan kemoterapi induksi.

Agen kemoterapi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan doxorubicin, sitarabin, kemoterapi intratekal (metrotexat, hidrokortison, ara c), dan etoposide. Doxorubicin mempengaruhi Bax, Bcl-2, Bcl-2-L12. Sitarabin mempengaruhi Bcl-2 dan Mcl-1 dan etoposid berpengaruh pada rasio Bax/Bcl2, Bax, Bcl-2, Bcl-xl dan Bcl2L12. Obat-obatan tersebut mempengaruhi pembelahan sel dan sintesis DNA.¹³ Pada penelitian ini, durasi kemoterapi tiap pasien berbeda. Hanya satu subjek penelitian yang mengalami remisi komplet mempunyai kadar Bax tinggi sebelum dilakukan kemoterapi.

Kesimpulan

Adanya peningkatan Bax tidak berhubungan signifikan dengan hasil respons kemoterapi fase induksi, peningkatan Bax akan menghasilkan remisi. Penurunan Bcl-2 berhubungan tidak signifikan dengan respons kemoterapi fase induksi, semakin turun Bcl-2 maka semakin menunjukkan remisi. Terdapat hubungan tidak signifikan antara rasio Bax/Bcl-2 dengan respons kemoterapi fase induksi dengan rentang korelasi agak rendah, semakin tinggi rasio Bax/Bcl2 semakin remisi.

Daftar Pustaka

1. Rubbitz JE. How to treat Pediatric Acute Leukemia. *Blood*. 2012; 119:5980-8.
2. Hassan M, Watari H, Almaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:150845. doi: 10.1155/2014/150845.
3. Kohler T, Schil C, Deininger MW, Krahl R, Borchert S, Hesenclever D, Leiblein S. High Bax and Bcl-2 mRNA Expression Correlate with Negative Outcome in Acute Myeloid Leukemia (AML). *Leukemia*. 2001; 16:22-29.
4. Shakankiry N, El Sayed G, Magrab S, Manoer M. Bcl-2 Protein Expression in Egyptian Acute Myeloid Leukemia. *J Egypt Nat Canc Inst*. 2009; 21:71-6.
5. Bekhet M, Fouad N, Fathey H, Sayed E, Hendawy L, Khattab D. Prognostic Value of Bcl-2 Association X Protein (Bax) Expression in Adult Egyptian Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Indian journal of medical research and Pharmaceutical sciences*. 2016; 5:1-6.
6. Kaparou M, Choumerineau D, Perkidogianni C, Martimianaki G, Maria K. Enhanced Levels of the Apoptosis Bax/Bcl-2 Ratio in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia and High Risk Feature. *Genetic and Molecular Biology*. 2013; 36:7- 11.
7. Vucicevic K, Jokovjevic V, Colovic N, Tomic N, Kostic T, Glumac I et al. Association of Bax Expression and Bcl-2/Bax Ratio with Clinical and Molecular Prognosis Markers in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Med Biochem*. 2016; 35:150-157.
8. Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gobson B, Dworzak MN, Adachi S, de Bont E, Harbott J, et al. Diagnosis and Management of Acute Myeloid Leukemia in Children and Adolescent: Recommendation from an International Expert Panel. *Blood*. 2012; 120(16):3187-3205.
9. Hossain J, Xie L. Sex Disparity in Childhood and Young Adult Acute Myeloid Leukemia (AML) Survival: Evidence from US Population Data. *Cancer Epidemiol*. 2015; 39:892-900.
10. Hara et al. Poor Prognostic Associated with FAB Subtypes M4 and M5 in Japanese Pediatric Acute Myeloid Leukemia Patient with FLT3- ITD. *Blood*. 2014; 124:100-102.
11. Bekhet M, Fouad N, Fathey H, Sayed E, Hendawy L, Khattab D. Prognostic Value of Bcl-2 Association X protein (Bax) Expression in Adult Egyptian patients With Acute Myeloid Leukemia. *Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences*. 2016; 5:1-6.
12. Sharawat S, Raina V, Kumar L, Sharma A, Bakhsi R, Vishnubhatla S et al. Quantitative Assessment of Bax Transcript and Flowcytometric Expression in Acute Myeloid Leukemia: Prospective Study. *Hematology*. 2014; 19:404-411.
13. Kontos C, Christodoulo M, Scorilas A. Apoptosis Related Bcl-2 Family Members: Key Players in Chemotherapy. *Anti Cancer Agent in Medical Chemistry*. 2013; 13:1-13.
14. Moon J, Sohn S, Lee M, Jang J. Bcl-2 Gene Polymorphism Could Predict the Treatment Outcome in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Leukemia Research*. 2009; 34:166-72.
15. Tzifi F, Economopaulo C, Gourgiotis D, Ardafanis A, Papageorgious S, Scorilas A. The Role of BCL-2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukimia. *Advances in hematology*. 2012; 10:1-10.
16. Hata A, Engelman J, Anthony F. The Bcl-2 Family: Key Mediators of Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. *American Association for Cancer Research*. 2015; 5:475- 87.

17. Kulsoom B, Shamsi TS, Afsar NA, Memon Z, Ahmed N, Hasnain SN *et al.* Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as Prognostic Markers in Acute Myeloid Leukemia: Are We Ready for Bcl-2 Directed Therapy. *Cancer Manag Res.* 2018; 10:403-416.