

**T.C.**  
**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ**  
**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU**

**İMATİNİB DİRENÇLİ K562R HÜCRE HATTINDA KEMATERAPÖTİK  
AJANLARIN OLUŞTURDUĞU REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN SIĞLA  
YAĞI İLE ORTADAN KALDIRILMASI**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Doç. Dr. Onur EROĞLU  
**PROJE NOSU:** 2019-01.BŞEÜ.04-01

**ARAŞTIRMACILAR:**  
**1-** Melike BÜGÜL KILINÇARSLAN

**BAŞLAMA TARİHİ:** 12.06.2019

**BİTİŞ TARİHİ:** 12.12.2020

**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ**  
**BİLECİK, 2021**

**T.C.**  
**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ**  
**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU**

**İMATİNİB DİRENÇLİ K562R HÜCRE HATTINDA KEMATERAPÖTİK  
AJANLARIN OLUŞTURDUĞU REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN SIĞLA  
YAĞI İLE ORTADAN KALDIRILMASI**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Doç. Dr. Onur EROĞLU  
**PROJE NOSU:** 2019-01.BŞEÜ.04-01

**ARAŞTIRMACILAR:**  
**1-** Melike BÜGÜL KILINÇARSLAN

**BAŞLAMA TARİHİ:** 12.06.2019

**BİTİŞ TARİHİ:**12.12.2020

**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ**  
**BİLECİK, 2021**

## ÖZET

### İMATİNİB DİRENÇLİ K562R HÜCRE HATTINDA KEMOTERAPÖTİK AJANLARIN OLUŞTURDUĞU REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN SIĞLA YAĞI İLE ORTADAN KALDIRILMASI

*Liquidambar orientalis* Mill (*Hamamelidaceae*)'den elde edilen Sweetgum Oil (SO) Türk halk hekimliğinde antiülserojenik olarak yüzyıllar boyunca kullanılmıştır. Antibakteriyel ve antioksidan aktivitesi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada K562R ve K562S hücre hatlarında sitotoksik dozda Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKİ) ile Sweetgum Oil kombinasyonunun reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunun otofaji üzerine etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda K562R ve K562S hücre hatlarında sitotoksiste, ROS oluşumu, DNA hasarı, otofaji, otofaji ile ilişkili proteinlerden otofagozom oluşumunda rol oynayan LC3 $\alpha/\beta$  proteini, vezikül uzamasında görevli Atg5 proteini ve ROS oluşumuna bağlı olarak inaktif hale gelen Atg4A proteininin ekspresyon seviyelerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda sıgla yağı kullanımında oluşan ROS'un K562R hücrelerinde ponatinibe kıyasla %28,8 oranında, K562S hücrelerinde ise imatinibe göre %23,8 oranında daha az olduğu görülmüştür. Sıgla yağı ile tedavi edilen hücrelerde tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi edilen hücrelere daha az DNA hasarı meydana gelmiştir. Sıgla yağının otofajiyi artırdığı LC3 $\alpha/\beta$  ve Atg5 proteinlerinin ekspresyonlarından anlaşılmaktadır. Ayrıca ROS'un fazla olduğu gruplarda Atg4A ekspresyonunun azaldığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** K562R, Sıgla Yağı, ROS, Otofaji

**ABSTRACT****ELIMINATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES FORMED BY  
CHEMOTHERAPEUTIC AGENT IN IMATINIB RESISTANT K562R CELL  
LINE BY SWEETGUM OIL**

Sweetgum Oil (SO) obtained from *Liquidambar orientalis* Mill (Hamamelidaceae) has been used in Turkish folk medicine as an antiulcerogenic for centuries. Its antibacterial and antioxidant activity has been shown in several studies. In this study, it was aimed to investigate the cytotoxic dose of Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI) and Sweetgum Oil combination on the formation of reactive oxygen species and their effects on autophagy in K562R and K562S cell lines. For this purpose, in K562R and K562S cell lines, cytotoxicity, ROS formation, DNA damage, autophagy, LC3 $\alpha/\beta$  protein, which plays a role in autophagy-related proteins autophagosome formation, Atg5 protein involved in vesicle elongation, and the effects of Atg4A protein, which becomes inactive due to ROS formation, were investigated. As a result of this work, it was observed that the ROS produced by using sweetgum oil was 28.8% less in K562R cells compared to ponatinib and 23.8% less in K562S cells than imatinib. Less DNA damage occurred to cells treated with tyrosine kinase inhibitors in cells treated with sweetgum oil. It is understood from the expressions of LC3 $\alpha/\beta$  and Atg5 proteins that sweetgum oil increases autophagy. In addition, it was observed that Atg4A expression decreased in the groups with high ROS.

**Keywords:** K562R, Sweetgum Oil, ROS, Autophagy

**TEŞEKKÜR**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi'ne 2019-01.BŞEÜ.04-01 numaralı bilimsel araştırma projesinin gerekleştirilmesi için mali desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

**Do. Dr. Onur EROĞLU**

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

<b>ÖZET.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ.....</b>	<b>vi</b>
<b>TABLolar LİSTESİ.....</b>	<b>viii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....</b>	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİ .....</b>	<b>3</b>
2.1. Kronik myeloid lösemi .....	3
2.2. BCR-ABL füzyon geni ve füzyon proteini .....	3
2.3. Philadelphia kromozomu .....	4
2.4. KML Tedavisi .....	5
2.4.1. Birinci nesil TKİ: İmatinib .....	6
2.4.2. Ponatinib.....	10
2.5. Liquidambar Orientalis (Sweetgum Oil, Sığla Yağı).....	10
2.6. Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	12
2.7. Otofaji .....	14
2.7.1. Otofaji Türleri .....	14
2.7.2. Otofajinin Mekanizması.....	15
2.8. Otofajinin Düzenlenmesinde ROS'un Rolü.....	17
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>19</b>
3.1. Materyaller .....	19

3.1.1. Kullanılan cihazlar .....	19
3.1.2. Sarf malzemeler.....	20
3.1.3. Kullanılan kimyasallar .....	21
3.1.4. Kullanılan çözeltiler .....	22
3.2. Yöntemler .....	26
3.2.1. Kullanılan hücre hatları .....	26
3.2.2. Kullanılan kemoterapötik ilaçların hazırlanması .....	28
3.2.3. Hücre kültürü.....	28
3.2.4. Hücre canlılığının değerlendirilmesi (tripan mavisi canlılık testi).....	30
3.2.5. Sitotoksosite çalışmaları.....	30
3.2.6. ROS tespiti .....	32
3.2.7. DNA hasarının belirlenmesi.....	32
3.2.8. Otofaji belirlenmesi.....	33
3.2.9. İmmünblotlama yöntemi .....	34
3.2.10. İstatistiksel analiz .....	36
<b>4. ANALİZ VE BULGULAR .....</b>	<b>37</b>
3.1. Ara Rapor Döneminde Yapılan Çalışmalar .....	37
3.2. Sonuç Raporu Döneminde Yapılan Çalışmalar .....	39
<b>5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER .....</b>	<b>48</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>52</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>56</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Kesme noktalarının ABL ve BCR genlerindeki yerleri ve çeşitli kesmelerden türetilen kimerik BCR / ABL mRNA transkriptlerinin yapısı .....	4
Şekil 2.2. Philadelphia kromozomu .....	5
Şekil 2.3. KML Tedavisinin Zaman Tablosu .....	6
Şekil 2.4. Abl'de imatinib bağlanma bölgesinin merkezinde Thr315 gatekeeper gösterilmesi. ....	7
Şekil 2.5. İmatinib'in etki mekanizması .....	8
Şekil 2.6. Direnç mekanizmaları .....	9
Şekil 2.7. <i>Liquidambar orientalis</i> 'in Türkiye'deki yayılış alanları.....	10
Şekil 2.8. ROS tarafından düzenlenen hücresel sinyal yolları. ....	12
Şekil 2.9. Dengesizliğin oksidatif strese yol açabileceği oksidan ve antioksidan türleri.....	14
Şekil 2.10. Üç tip otofajinin şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.11. Otofaji basamakları .....	16
Şekil 4.1. K562R hücre hattında sıgla yağı MTT sonuçları.....	38
Şekil 4.2. K562R hücre hattında ponatinib MTT sonuçları .....	39
Şekil 4.3. 1 µM imatinib eklenmiş büyüme ortamında ponatinib ve sıgla yağı kombine MTT sonuçları .....	39
Şekil 4.4. İmatinib eklenmemiş büyüme ortamında ponatinib ve sıgla yağı kombine MTT sonuçları .....	39
Şekil 4.5. K562S hücre hattında sweetgum oil MTT sonuçları .....	40
Şekil 4.6. K562s hücre hattında imatinib MTT sonuçları .....	41
Şekil 4.7. K562s hücre hattında imatinib ve sweetgum oil kombine MTT sonuçları.....	41
Şekil 4.8. K562R hücrelerinde oluşan ROS'un floresan mikroskop ile gösterilmesi.....	42
Şekil 4.9. K562S hücrelerinde oluşan ROS'un floresan mikroskop ile gösterilmesi.....	42
Şekil 4.10. K562R hücrelerinde DNA kırıklarının floresan mikroskop ile gösterilmesi.....	43

<b>Şekil 4.11.</b> K562S hücrelerinde DNA kırıklarının floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x).....	<b>43</b>
<b>Şekil 4.12.</b> Agaroz jel elektroforezi ile DNA kırıklarının gösterilmesi .....	<b>43</b>
<b>Şekil 4.13.</b> 40X büyütme ile K562R hücrelerinde oluşan otofaji. ....	<b>44</b>
<b>Şekil 4.14.</b> 40X büyütme ile K562S hücrelerinde oluşan otofaji.....	<b>45</b>
<b>Şekil 4.15.</b> Otofaji Grafiği.....	<b>45</b>
<b>Şekil 4.16.</b> A) K562R hücrelerinde Atg5, Atg4A, LC3 $\alpha/\beta$ ve GAPDH proteinlerine ait western blot görüntüleri B) K562R hücrelerinde Atg5, Atg4A, LC3 $\alpha/\beta$ ve GAPDH proteinlerine ait katlı değişim grafiği .....	<b>46</b>
<b>Şekil 4.17.</b> A) K562S hücrelerinde Atg5, Atg4A, LC3 $\alpha/\beta$ ve GAPDH proteinlerine ait western blot görüntüleri B) K562S hücrelerinde Atg5, Atg4A, LC3 $\alpha/\beta$ ve GAPDH proteinlerine ait katlı değişim grafiği .....	<b>47</b>

**TABLolar LİSTESİ**

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 3.1.</b> Kullanılan cihazlar .....	<b>19</b>
<b>Tablo 3.2.</b> Kullanılan malzemeler .....	<b>20</b>
<b>Tablo 3.3.</b> Laboratuvarında kullanılan kimyasallar .....	<b>21</b>
<b>Tablo 3.4.</b> 1X PBS tampon içeriği .....	<b>23</b>
<b>Tablo 3.5.</b> Lyzis buffer içeriği .....	<b>24</b>
<b>Tablo 3.6.</b> TE buffer içeriği .....	<b>24</b>
<b>Tablo 3.7.</b> 50X TAE içeriği .....	<b>24</b>
<b>Tablo 3.8.</b> SDS poliakrilamid jel içeriği .....	<b>25</b>
<b>Tablo 3.9.</b> 10X Towbin transfer tamponu içeriği .....	<b>26</b>
<b>Tablo 3.10.</b> K562R Hücre Hattı Özellikleri .....	<b>27</b>
<b>Tablo 3.11.</b> K562S Hücre Hattı Özellikleri .....	<b>27</b>

**KISALTMALAR VE GÖSTERİMLER**

<b><math>\cdot</math>-OH</b>	: Hidroksil radikal
<b><math>\mu</math>-BCR</b>	: Mikro BCR
<b><math>\mu</math>g/ml</b>	: Mikrogram / mililitre
<b><math>\mu</math>M</b>	: Mikromolar
<b>ABL</b>	: Abelson Mürin Lösemi Virüsü
<b>ALL</b>	: Akut Lenfoblastik Lösemi
<b>alloSCT</b>	: Allojenik Kök Hücre Transplantasyonu
<b>AML</b>	: Akut Myeloid Lösemi
<b>APS</b>	: Amonyum Persülfat
<b>Atg</b>	: Otofaji İlişkili Protein
<b>BCR</b>	: Kırılma Noktası Küme Bölgesi (Breakpoint Cluster Region)
<b>BP-KML</b>	: Blastik Faz Kronik Myeloid Lösemi
<b>BSA</b>	: Sığır Serum Albumin
<b>CHR</b>	: Tam hematolojik yanıt
<b>CMA</b>	: Şaperon aracılı otofaji
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>CP-KML</b>	: Kronik Faz Kronik Myeloid Lösemi
<b>DMSO</b>	: Dimetilsülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DPPH</b>	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil Radikali
<b>ECL</b>	: Güçlendirilmiş Kemilüminesans
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>EtBr</b>	: Etidyum Bromür
<b>FBS</b>	: Fetal Sığır Serum

<b>FE</b>	: Fosfotidiletanolamin
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen eProksit
<b>H<sub>2</sub>DCFDA</b>	: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein Diacetate
<b>HBSS</b>	: Hanks'in Dengeli Tuz çözeltisi
<b>HEPES</b>	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Yarı-maksimal inhibitör konsantrasyon
<b>IM</b>	: İmatinib
<b>KLL</b>	: Kronik Lenfoblastik Lösemi
<b>KML</b>	: Kronik Myeloid Lösemi
<b>LC3 <math>\alpha/\beta</math></b>	: Mikrotübül ile ilişkili protein 1A / 1B-hafif zincir 3
<b>m-BCR</b>	: Minör BCR
<b>M-BCR</b>	: Majör BCR
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
<b>Ph</b>	: Philadelphia Kromozomu
<b>PI-3 kinaz</b>	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
<b>PMSF</b>	: Fenilmetilsülfonil Florid
<b>PVDF</b>	: Poliviniliden Florid
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>TAE</b>	: Tris-Asetikasit-EDTA
<b>TBS</b>	: Tris- Tamponlu Tuz Çözeltisi
<b>TBS-T</b>	: Tween 20 İçeren Tris- Tamponlu Tuz Çözeltisi
<b>TE</b>	: Tris- EDTA
<b>TKİ</b>	: Tirozin Kinaz İnhibitörü

## 1. GİRİŞ

Kronik myeloid lösemi (KML), 9. kromozom ile 22. kromozom arasında karşılıklı translokasyon ile üretilen BCR/ABL onkoproteininin varlığı ile karakterize edilen malign hematolojik bir hastalıktır (Deininger, vd., 2000:1) İmatinib (STI571 veya Gleevec), KML için birinci basamak tedavi olarak kullanılır ve KML hastalarının tedavisinde oldukça etkilidir (Clarkson, vd., 2003:32). Kronik faz KML'nin uzamış tedavisinden sonra imatinib direncini geliştirir ve hızlandırılmış faz veya blast kriz fazı KML'si olan hastalar imatinib tedavisine dirençli hale gelir (England, 2002:2; Sawyers, vd., 2002:9). K562R hücre dizisi, blast krizinde bir insan KML hastasından oluşturulan hematopoietik bir progenitör hücre dizisidir (Clarkson, vd., 2003:6; Drexler, 1994:1). Ponatinib'in tedaviye dirençli KML hastalarında BCR-ABL T315I mutasyonunun aktivitesini inhibe edebildiği O'Hare ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (O'Hare, T., vd., 2009:5)

*Liquidambar orientalis* Mill (Hamamelidaceae)'dan elde edilen Sweetgum Oil (SO) Türk halk hekimliğinde antiülserojenik olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır (Gurbuz, vd., 2013:3). SO'nun antibakteriyel aktivitesi Sağdıç ve arkadaşlarının yaptığı in vitro tekniklerle bildirilmiştir (Sagdic, vd., 2005:2). Topal ve arkadaşları tarafından DPPH testi ile antioksidan aktivitesi de belirlenmiştir (Topal, vd., 2008:15). Süzek ve arkadaşları SO'nin antioksidan aktivitesini kapsamlı bir şekilde araştırmışlardır. Araştırmaları sonucunda elde edilen verilere göre SO'in koruyucu bir özellikte olduğu ve antioksidan aktivitesi olduğunu belirtmişlerdir (Suzek, vd.,2016:5). *Liquidambar orientalis*, Türkiye'nin güneybatı sahil bölgesinde; Köyceğiz, Fethiye, Marmaris ve Ula'da görülmektedir. SO, *Liquidambar orientalis*'in yaralı gövdesinden elde edilen "Sığla Yağı" adıyla yerel olarak isimlendirilen reçineli bir eksüdatıdır (Suzek, vd.,2016:2).

BCR/ABL kinazın, oksidatif DNA hasarına ve kinaz alanında mutasyonlara neden olan reaktif oksijen türlerini (ROS) uyardığı ve lösemi hücrelerinde ROS'un antioksidanlar ile inhibisyonunun imatinib direncini azalttığı literatürde bildirilmiştir (Koptyra, vd., 2006:5). Halliwell ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada DNA, lipid ve

proteinlere oksidatif hasarın kardiyovasküler hastalık, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların gelişimine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Halliwell, 1996:1).

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır (Arslan, vd., 2011:1).

Bu projenin amacı kronik myeloid lösemi (KML) hastalarının tedavisinde birinci basamak tedavi olarak kullanılan imatinibe ileri safhalarda direnç geliştirmiş olan K562R kronik myeloid lösemi hücre hattında, kemoterapötik ajanların kullanımı nedeniyle oluşan reaktif oksijen türlerini (ROS) ortadan kaldırmak ve böylelikle DNA hasarlarının önüne geçebilmektir. Bu amaç için literatürde antioksidan aktivitesi bildirilmiş olan sığla yağının kullanımı araştırılmıştır. Sığla yağının kullanılmasıyla dirençli hücrelerde otofaji aktivasyonu sağlanılmıştır. Sığla yağının hematolojik malignitelerde kullanımı ile ilgili literatürde bir çalışmaya rastlanılmamış olup bu çalışma özgün niteliktedir.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Kronik Myeloid Lösemi

Kronik myeloid lösemi ilk olarak 1845'te tanımlanmıştır. Philadelphia kromozomu, 9. Kromozomdaki ABL onkogeni ile 22. kromozomdaki BCR bölgesi arasındaki karşılıklı translokasyonun bir sonucu olarak oluşan BCR-ABL füzyon geninden üretilir. BCR-ABL füzyon geni, KML vakalarının %90'undan fazlasında görülür (Frazer, vd., 2014:7). Oluşan füzyon protein tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve hastalıkta neden olarak kabul edilir dolayısıyla tirozin kinaz inhibitörleri bu hastalığın tedavisi için kullanılır (Staal, vd., 2016:5).

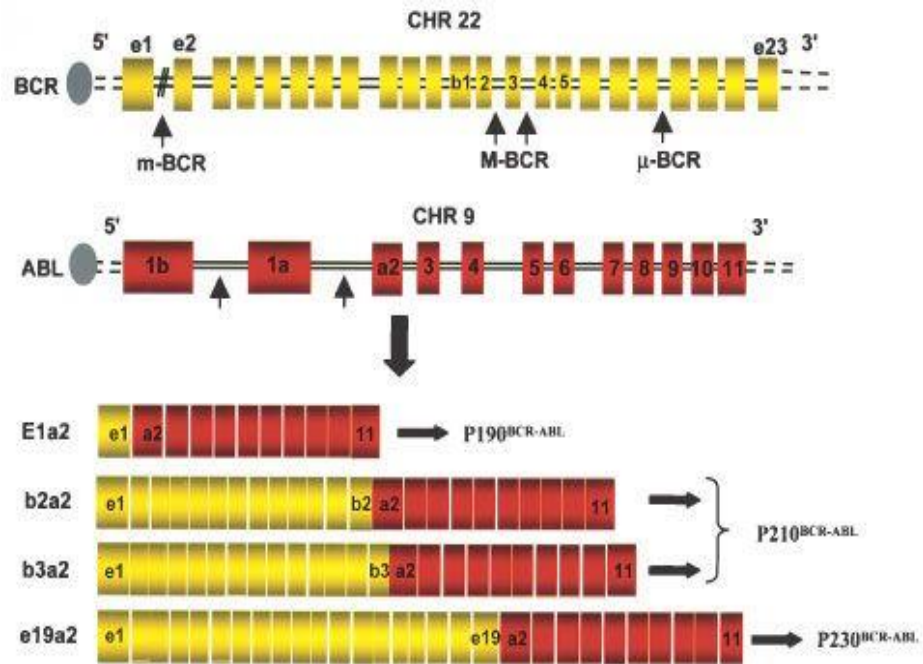
KML üç fazda ortaya çıkar: Kronik faz (CP), akselere faz (AP) ve blastik faz (BP) (Deotare, vd., 2016:2). Hastaların çoğunluğu, başlangıçta kronik faz hastalığı olan, tedavi ile kolayca kontrol edilen ve ortanca süresi 3-4 yıl süren hastalardır. Etkili tedavinin yokluğunda KML hastalarının çoğunda kronik fazdan blastik faza dönüşüm kaçınılmazdır. Hastaların %70 ila %85'inde gelişen blastik kriz morfolojik olarak akut lösemiye benzer, ancak kemoterapiye çok dirençlidir. Blastik fazdaki hastalar genellikle 3-6 ay içinde ölür (Cortes, vd., 1988:1; Patel, vd.,2017:3).

Ph kromozomu, hastalığın kronik aşamasında mevcut olan tek sitogenetik anormalliktir. Hastaların yaklaşık % 85'i kronik evrede teşhis edilir ve hastalığın bu aşaması tedaviye cevap verir. Hastalık akselere faz ve blastik faza doğru ilerledikçe, ek sitogenetik anormallikler ortaya çıkmaktadır (Frazer, vd., 2007:1).

### 2.2. BCR-ABL füzyon geni ve füzyon proteini

BCR-ABL füzyonunun etkinliği tüm lösemik hastalarda tam olarak aynı değildir. Aktivitedeki bu farkın sebebinin, BCR-ABL füzyon geninde BCR geninin farklı kırılma noktalarından kaynaklandığı bulunmuştur. Temel olarak, üç kırılma noktasının gen füzyonunda rol oynadığı bildirilmiştir. Bunlar; ilk intronda minör BCR (m-BCR) p190, 12-16 ekzonlar arasında majör BCR (M-BCR) p210 ve 19. İntronda mikro BCR ( $\mu$ -BCR) p230 olarak adlandırılan farklı molekül ağırlığına ve farklı kinaz aktivitesine sahip üç farklı onkoproteinle sonuçlanmıştır (Kunnumakkara, vd., 2017:2,3). Kimerik proteindeki Abl kısmının sabit olduğu gözlemine dayanarak, BCR

dizisinin farklı boyutlarının, hastalığın fenotipini dikte edebileceği sonucuna varılmıştır (Deininger, vd., 2000:1,2).



**Şekil 2.1.** Kesme noktalarının ABL ve BCR genlerindeki yerleri ve çeşitli kesmelerden türetilen kimerik BCR / ABL mRNA transkriptlerinin yapısı

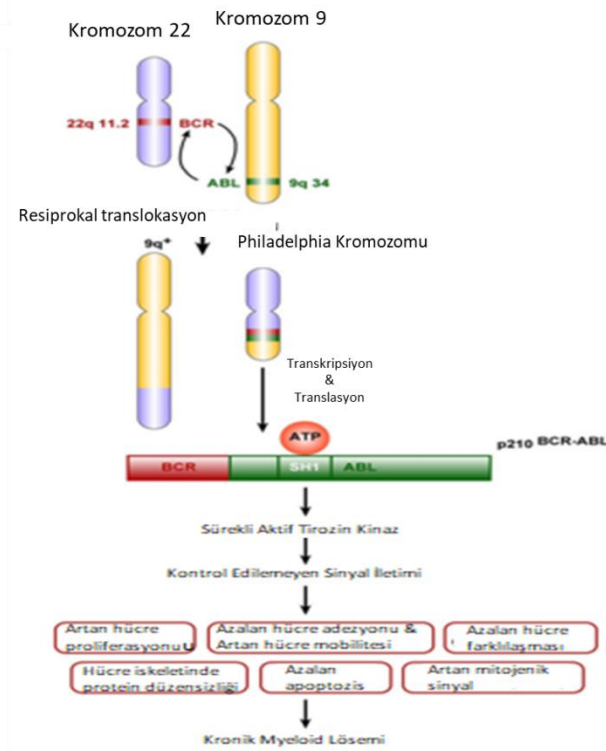
**Kaynak:** (Salesse & Verfaillie, 2002:2).

p210'un KML ile daha fazla ilişkili olduğu bulunmuştur (Kunnumakkara, vd., 2017:3). Birçok sinyal yolunun p210 ile aktive edilmesi, hücre çoğalmasının kontrolü ve farklılaşması, yapışma ve hücre sağkalımı gibi temel hücrel işlemlere müdahale ederek kötü huylu transformasyona yol açar (Salesse ve Verfaillie, 2002:2)

BCR-ABL'in, kronik oksidatif DNA hasarı, S ve G2 / M hücre döngüsü fazlarında çift iplikli kopmalar (DSB'ler) ve mutajenez ile sonuçlanan endojen reaktif oksijen türlerini (ROS) indüklediği gösterilmiştir. Sonuç olarak BCR-ABL kaynaklı olarak oluşan ROS'un, DNA onarım yollarının anormal düzenlenmesiyle kombinasyon halinde, KML hücrelerinde bir mutator fenotipine katkıda bulunduğunu ve nokta mutasyonları ve sitogenetik anormallikler ile sonuçlanarak genomik dengesizliklere neden olduğunu göstermektedir ("Molecular biology of BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia.pdf," n.d.:6).

### 2.3. Philadelphia kromozomu

Kromozom 22 üzerindeki BCR geninin 5' ucu ile, kromozom 9 üzerindeki ABL-proto-onkogeninin 3' ucunun yan yana gelmesiyle Ph kromozomu oluşur. Ph kromozomu, kronik miyeloid lösemi hastalarının yaklaşık % 95'inde ve erişkin akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalarının % 20'sinde bulunur. Ph translokasyonu, yapısal olarak aktif bir tirozin kinaz ile karakterize edilen onkojenik BCR-ABL füzyon proteinine yol açar (Frazer, vd., 2007:1; von Bubnoff, vd.,2003:1).



Şekil 2.2. Philadelphia kromozomu

Kaynak: (Frazer, vd., 2007:3'ten değiştirilerek alınmıştır.)

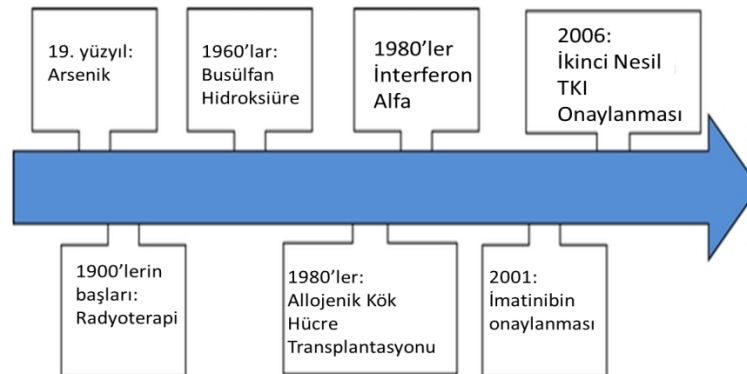
## 2.4. KML Tedavisi

KML'de tedaviye hasta yaşı ve hastalığın evresine göre karar verilmektedir. Başlangıçta hastalar WBC sayısının hızlı kontrolünü sağlamak için hidroksiüre ile sitoredüktif kemoterapi alır. Busulfan, etkili hematolojik kontrol sağladığı gösterilen ilk ajandı. Hidroksiüre mükemmel bir kütle çözme maddesidir ve kan sayısının kontrolünü sağlar ve hastaların% 50-80'inde hematolojik tepkilere neden olur. Sitogenetik tepkiler nadirdir ve bu nedenle hidroksiüre, KML'nin doğal geçmişi değiştirmez. Hidroksiüre, diğer tedavilere bir yardımcı olarak ve aynı zamanda alloSCT'nin hazırlanmasında

hastalığın kontrolünde, ilk sitoredüksiyonda çok etkilidir. Ancak, KML'li hastalarda tek ajan tanımlayıcı bir tedavi olarak kullanılmamalıdır (Hochhaus, vd., 2019:3,4).

alloSCT, kronik faz KML'de seçilmiş hastalarda etkili ve iyileştirici bir terapi şeklidir ve 3-5 yıllık sağkalım oranları % 40-80 arasında değişmektedir. Transplant ilişkili mortalite (TRM), diğer faktörlerin yanı sıra, hasta yaşı, donör orijini ve eşleşme derecesine bağlı olarak % 5-50 arasında değişmektedir. Transplantasyon sonucunu etkileyen en önemli iki faktör hasta yaşı ve hastalığın evresidir. Nakil merkezlerinin çoğu, transplantasyonun erken evre KML'de yapılmasını önermektedir (Hochhaus, vd., 2019:4).

KML tedavisi, 1980'li yıllardan bu güne kadar interferon bazlı kombinasyonların geliştirilmesi ve allojenik kök hücre transplantasyonundaki (alloSCT) gelişmeler ile sağlanmıştır. Daha yakın zamanlarda, imatinib mesilatın ortaya çıkışı ile hastalığın tüm aşamalarında anti-KML aktivitesi olan spesifik bir BCR/ABL tirozin kinaz inhibitörü olarak kullanılmıştır (Hamad, vd., 2013:2; Hochhaus, vd., 2019:1).



**Şekil 2.3.** KML Tedavisinin Zaman Tablosu

**Kaynak:** (Hamad, vd., 2013:2'den değiştirilerek alınmıştır.)

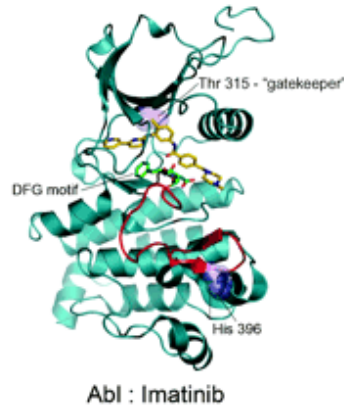
#### 2.4.1. Birinci nesil TKİ: İmatinib

İmatinib mesilat (IM), KML hastalarında tedavi için ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 2002 yılında onaylanmış spesifik bir tirozin kinaz inhibitördür. KML hastaları için imatinib mesilat standart birinci basamak tedavidir. Bununla birlikte, ana

imatinib direnci, imatinib tedavisi alan hastalarda % 20-25 oranında gözlenmiştir (Bhamidipati, vd., 2013:1; Mirza, vd.,2019:1).

İmatinib, son on yıldaki CP-KML tedavisinin temel dayanağı olmuştur ve AP ve BP-KML'deki önceki çalışmalarda da etkili bir şekilde kullanılmıştır. AP-KML için imatinib ile tedavi edilen hastaların ortalama sağkalım süresi 37-47 ay arasında ve BP için 7 ay olarak gözlenmiştir (Deotare, vd., 2016:3).

KML hastalarının imatinib ile tedaviye genel olarak olumlu tepki göstermesine rağmen, zamanla ilaca direnç gösteren mutasyonların birikmesi ciddi bir problemdir. T315I mutasyonu, imatinib tedavisi alan hastalarda görülen en yaygın mutasyonlardandır ve dirençli vakaların %15'inden sorumludur. Thr<sup>315</sup>, ABL'de imatinib bağlanma bölgesinin merkezinde bulunur. Bu pozisyondaki kalıntı, protein kinazlardaki "gatekeeper" kalıntısı olarak adlandırılır, çünkü ATP bağlama bölgesini farklı protein kinazlarında değişken büyüklükteki bir iç boşluktan ayırır (Young, vd., 2006:2).



**Şekil 2.4.** Abl'de imatinib bağlanma bölgesinin merkezinde Thr315 gatekeeper gösterilmesi

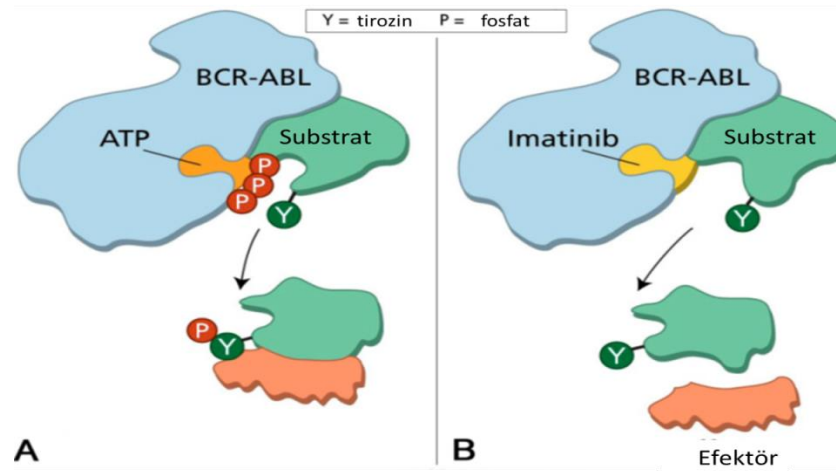
**Kaynak:** (Young, vd., 2006:2)

Bcr/Abl füzyon proteininin varlığı KML'yi geleneksel terapötik yaklaşımlara karşı dirençli kılar. Imatinib, BCR/ABL'nin ATP bağlayıcı cebini işgal ederek tirozin kinaz aktivitesini etkili bir şekilde inhibe eder, böylece sonraki sinyal iletimini ortadan kaldırır. İmatinib direnci ise zamanla gelişir ve KML hastaları için ciddi bir sorundur. Direnç vakalarının çoğu, BCR/ABL'nin kinaz alanındaki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Kombine kemoterapi hala insan kronik miyelojenöz lösemi için

kritik bir terapötik yöntemdir. Bununla birlikte, moleküler hedefe yönelik tedavilere direnç ve hoşgörüsüzlük önemli klinik konulardır. Bu nedenle, lösemi tedavisi için düşük toksisiteye sahip yüksek etkili ilaçların bulunması hala önemli ve acil bir görevdir (Hao, vd., 2020:2).

İmatinib etki mekanizması;

İmatinib, Bcr/Abl proteininin ATP bağlayıcı cebini işgal etmekte ve böylece ATP'ye erişimi önlemektedir (Mughal, T. ve Goldman, 2006:4).



**Şekil 2.5.** İmatinib'in etki mekanizması

**Kaynak:** (Mughal, T. and Goldman, 2006:5'ten değiştirilerek alınmıştır.)

İmatinib ATP bağlama bölgesini işgal ettiğinde, substratın fosforilasyonunu önler. Bu molekül sırayla efektör protein ile temas kuramaz ve 'lösemi sinyali' iletecek olan sinyal iletim yolu ile kesilir (Mughal, T. ve Goldman, 2006:5).

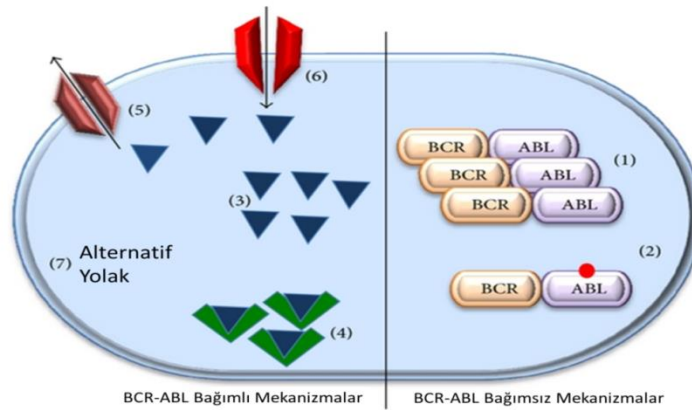
İmatinib direnci ve etkili mekanizmalar;

Tedavi edilen KML hastalarının %95'inde tam bir hematolojik remisyon ve %60'ında majör sitogenetik yanıt görülür. Buna rağmen, blastik krizdeki KML hastalarında ve Ph+ ALL hastalarında remisyonlar kısa sürelidir ve ilaca karşı direnç gelişmektedir. İmatinib direnci, kronik fazda KML'li hastaların %3 ila 4'ünde görülmektedir (Corbin, vd., 2003:1; Kantarjian, 2019:1; von Bubnoff, vd., 2003:1).

İmatinib'e karşı birincil direnç olarak adlandırılan durumda bazı hastalar tedavinin başlangıcında cevap vermez ve hiçbir zaman tam bir hematolojik, sitogenetik veya moleküler tepkiye de ulaşamayabilir. Tedaviye başlangıçta yanıt veren hastalarda

ise belli bir süre sonra yanıt kaybedilebilir. Bu durum ise ikincil direnç geliştiği anlamına gelmektedir.

İki ana direnç mekanizması grubu vardır. Bunlar; BCR/ABL bağımsız mekanizmaları ve BCR/ABL bağımlı mekanizmalarıdır. BCR/ABL'ye bağılı direnç mekanizmaları, yüksek bir ABL kinaz aktivitesine neden olabilecek BCR/ABL onkogenin çoğaltılmasını veya aşırı çoğaltılmasını içerir (Hamad, vd., 2013:4).



**Şekil 2.6.** Direnç mekanizmaları

**Kaynak:** (Hamad, vd., 2013:5)

En yaygın olarak tanımlanan imatinib direnci mekanizması, BCR/ABL kinaz bölgesi içindeki mutasyonlardır. Bcr/Abl onkoproteinde imatinibin etkisiz kaldığı 55'in üzerinde mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar, imatinibin bağlanma bölgesini, imatinibin bağlanmadığı aktif forma dönüştürür. BCR/ABL'nin en yaygın mutasyonlarından biri, ABL geninde bir tek nükleotit değişimi olan T315I mutasyonudur (Thr315-Ile315; T315I). Bu mutasyon, imatinibin sterik engel nedeniyle ATP bağlama bölgesine bağlanmasını imkansız kılar (Dong, vd., 2019:2; Hamad, vd., 2013:4).

Met244Val, Gly250Glu, Gln252His, Phe311Leu, Phe317Leu, Glu355Gly, Phe359Val, Val379Ile, Leu387Met ve His396Pro / Arg dahil olmak üzere ek mutasyonlar, daha düşük bir frekansta tespit edilmiştir (Corbin, vd., 2003:1).

BCR/ABL bağımsız mekanizmalar ise hücre içi imatinib seviyesinde bir azalmaya yol açan ilaç efflux, ilaç influx, ilaç bağlama veya ilaç konsantrasyonuyla

ilgili komplikasyonlardır. İmatinibe karşı ikinci ana direnç kategorisindedir (Hamad, vd., 2013:5).

#### **2.4.2. Ponatinib**

İmatinib, hastalığı uzun remisyon dönemleri olan kronik bir hastalığa dönüştürmüştür. Dirençli KML hastalarının tedavisi için ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörleri; bosutinib, ponatinib ve TKİ olmayan omasetaksin 2012 yılında onaylanmıştır (Balcı Güçlü, A. G., vd., 2020:2). Ponatinib (AP24534), BCR/ABL'yi özellikle imatinib, dasatinib, nilotinib ve bosutinib gibi diğer TKİ'ye karşı direnç sağlayan T315I mutasyonunu inhibe etmek için tasarlanmış oral olarak uygulanan bir TKİ'dir. Ponatinib'in karbon-karbon üçlü bağı ile metilfenil ve pürin grupları sterik girişim olmadan T315I mutasyonuna bağlanmasına izin vermektedir (Hamad, vd., 2013:4).

#### **2.5. *Liquidambar orientalis* (Sweetgum Oil, Sığla Yağı)**

*Liquidambar orientalis* ağacı Türkiye'de 'Sığla ağacı' veya 'Günlük ağacı' olarak bilinmektedir. *L. orientalis*, tıbbi ve kozmetik özelliklere sahip otsu bir bitkidir (Okmen, vd., 2014:1).

*Liquidambar orientalis* Türkiye'nin güneybatı kıyılarında, özellikle Köyceğiz, Fethiye, Marmaris ve Ula'da yayılmaktadır. Sweetgum oil, *Liquidambar orientalis*'in yaralı gövdesinden elde edilen “Sığla Yağı” olarak adlandırılan reçineli bir eksüdatıdır (Duru, vd., 2002:1; Karadeniz, vd., 2013:1; Suzek, vd., 2016:2)



**Şekil 2.7.** Liquidambar orientalis'in Türkiye'deki yayılış alanları

**Kaynak:** (Murat & Kaya, 2003:5'ten değiştirilerek alınmıştır.)

*Liquidambar orientalis* Türk halk hekimliğinde topikal parazitisit, balgam söktürücü ve bazı cilt hastalıklarının tedavisi için kullanılır, ağacın yaralanmasıyla üretilen ekstraktın, iyi antiseptik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca karakteristik acı bir tada ve kokuya sahiptir. Parfümeri ve kozmetik endüstrisinde fiksatif olarak kullanılmaktadır (Duru, vd., 2002:1; Karadeniz, vd., 2013:1; Okmen, vd., 2014:2).

Sığla yağı %45 oranında fenolik bir bileşik olan sinnamik asit içermektedir. Sinnamik asit içeren bitki ekstraktları ile yapılan çalışmalarda bu maddenin antioksidan, antibakteriyel ve antiinflamatuvar özelliği gösterilmiştir. Bu çalışmalarda sinnamik asidin bazı hücreleri lipid peroksidasyonundan ve oksidatif toksinlere bağlı olarak ortaya çıkan hasardan koruduğu da gösterilmiştir. İnsanlar üzerindeki farmakokinetiği hakkında çok detaylı bilgiler bulunmamaktadır ancak sığla yağının sinnamik asit ile antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal etki gösterdiği düşünülmektedir (Aydingöz ve Bulut, 2014:4).

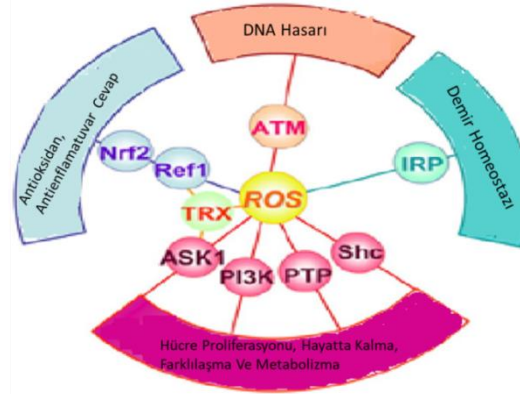
Sığla yağının çıkartılması;

1) Sığla ağacından yağ çıkarılması ağaçta yara açılmasıyla olur. Önce yara açılacak kısımlar üzerindeki kabuk mart ayı sonuna doğru yontularak inceltir.

- 2) Ağaçlar bir ay bu şekilde bırakılır. Mayıs ayı sonunda kaşık adı verilen bir aletle yaraların açılmasına başlanır. Bu yaralara damar adı verilir ve dış kabuk, diri kabuk, kambiyum ve çok az miktarda diri oduna girecek şekilde açılır.
- 3) Bir hafta sonra yaraların tazelenmesi işlemi gerçekleştirilir ve bu işleme sur adı verilir. Bu işlemden iki hafta sonra, damarlar içinde biriken yağ sıyrılarak alınır ve bu işleme de sur arkası denir. Bundan sonra esas sığla yağının alınması işlemine geçilir.
- 4) Bu işlem temmuz ayının ortasından ekim ayının sonuna kadar devam eder. Bu süre içinde her on beş günde bir yaralar üzerinde biriken yağ, kabuk ve odun tabakalarıyla birlikte kaşıkla yontularak alınır.
- 5) Bunlar işçilerin önlerine astıkları torbalar içerisinde toplanır. Bu işleme ise sefer adı verilir. Kapçık adı verilen bakır kaplarda yağ ile birlikte kabuk ve odun içeren yongalar toplanır ve su içerisinde 30-90 dk kaynatılır.
- 6) Sonra kaynatılan yongalar keçi kılından yapılmış torbalara konur. Bu torbalar preslenerek sığla yağı çıkartılır.
- 7) Çıkan yağ beton havuzlarda toplanır. Presleme sonunda torbalar içinde kalan ve yağ bulaşmış haldeki artık (küspe) da kurutulur. Bu artıklara günlük veya buhur adı verilir (Aydıngöz ve Bulut, 2014:2)

## 2.6. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri, mitokondriyal oksidatif metabolizmanın ya da NADPH oksidaz enzimlerinin bir yan ürünü olarak üretilir. ROS, süperoksit anyon ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikal ( $^{\cdot}OH$ ) içeren radikal ve radikal olmayan oksijen türlerinden oluşmaktadır (Mi, vd., 2018:1). ROS kimyasal olarak oksijenden daha aktiftir ve hücrel homeostaz ile ilişkilendirilmektedir. ROS, normal konsantrasyonlardayken; hücrelerin büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen çeşitli sinyal iletim olaylarında rol oynayan ikinci haberciler olarak görev yapmaktadır (Y. F. Chen, vd., 2017:2).



**Şekil 2.8.** ROS tarafından düzenlenen hücresel sinyal yolları

**Kaynak:** (Michels, 2003'ten değiştirilerek alınmıştır.)

Reaktif oksijen türleri her yerde bulunmaktadır ve hücresel sinyallemede önemli bir rol oynamaktadır. ROS sinyallemesi, kanser indüksiyonu ve ilerlemesine katkıda bulunabilmektedir. Ancak en doğrudan ilişkilendirme genomik instabilitedir. Neredeyse tüm kanser hücrelerinde genomik instabilite gözlenmektedir. Genomdaki DNA mutasyonlarının ve kromozomal yeniden düzenlemelerin tümü genomik instabilite olarak tanımlanmaktadır. Bu değişiklikler DNA hasarlarından kaynaklanmaktadır. Kansere bağlı olarak gözlenen ROS DNA'ya verdiği zararın yanı sıra DNA onarım proteinlerine de zarar verebilmektedir. Bu durum artan genomik instabiliteye neden olmaktadır (Antoszewska-Smith, vd., 2017:2).

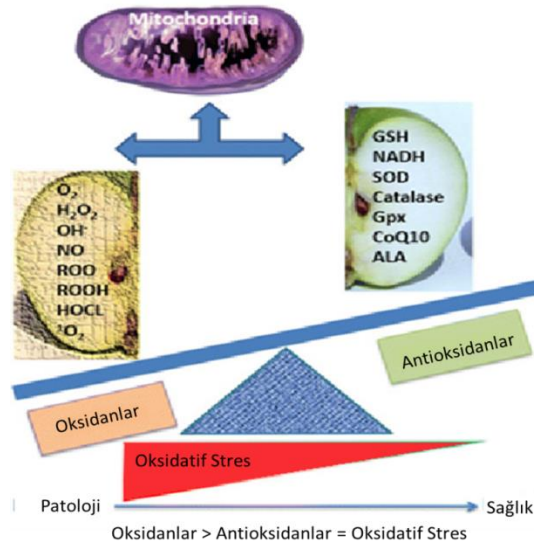
ROS, DNA hasarına neden olarak transformasyonu indükleyebilmektedir ve transforme hücrelerin normal hücrelere kıyasla daha yüksek ROS üretim seviyelerine sahip olmaları sebebiyle kanserle ilişkili olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. ROS üretiminin artmasının, genomik instabilite ve DNA hasarı ile ilişkilendirilmesinin yanı sıra hücre proliferasyonunu ve hücre göçünü teşvik etmek için bir sinyalleşme fonksiyonunu gerçekleştirerek lösemik hücre dönüşümüne katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Mi, vd., 2018:1,2).

Hematopoietik hücrelerde hidrojen ile indüklendiğinde oksidatif stres oluşmakta ve BCR/ABL eksprese eden hücrelerde anti-apoptotik ve proliferatif sinyallemesi, KML ile sonuçlanmaktadır. KML'nin ilerlemesi ise küçük moleküler ağırlıklı antioksidanlar dahil olmak üzere ROS seviyelerini modüle eden kimyasallardan etkilenebilmektedir. İmatinib ve diğer TKI'lerinin, BCR/ABL-pozitif hücrelerde ROS seviyesini düşürdüğü

gösterilmiştir. Ancak bu etki yetersizdir ve TKİ'lerle gerçekleştirilen KML tedavisi, ROS temizleyicileri kullanılarak güçlendirilebilmektedir (Antoszevska-Smith, vd., 2017:5).

Normal ROS seviyeleri, hücrelerin çoğalma ve farklılaşmalarının düzenlenerek fizyolojik işlevlerinin korunması ve immün tepkileri ve hücrel enflamasyonun kontrol edilmesi için gereklidir (Owusu-Ansah ve Banerjee, 2009:3). Normal seviyede ROS, HSC'lerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve mobilizasyonunu kontrol etmek için bir sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır. Ancak antioksidan sistemler arasında oluşan dengesizlik, ROS'un aşırı üretilmesine ve hücrelerde birikmesine neden olur. Yüksek ROS seviyeleri, HSC'lerde DNA hasarına neden olabilir ve bu durum anormal proliferasyon ve farklılaşma gibi işlev bozukluklarına yol açmaktadır (Y. F. Chen, vd., 2017:2)

Antioksidanlar homeostatik ayar noktasının altına düştüğünde hücre proliferasyonu kesintiye uğrayabilir. ROS, protein, lipit ve DNA'ya zarar vererek hücrel fonksiyon bozukluğuna ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Artan ROS zararlı olabilir yaşlanmaya ve yaşa bağlı hastalıklara neden olabilir (Udensi ve Tchounwou, 2014:2).



**Şekil 2.9.** Dengesizliğin oksidatif strese yol açabileceği oksidan ve antioksidan türleri

**Kaynak:** (Udensi & Tchounwou, 2014:2'den değiştirilerek alınmıştır.)

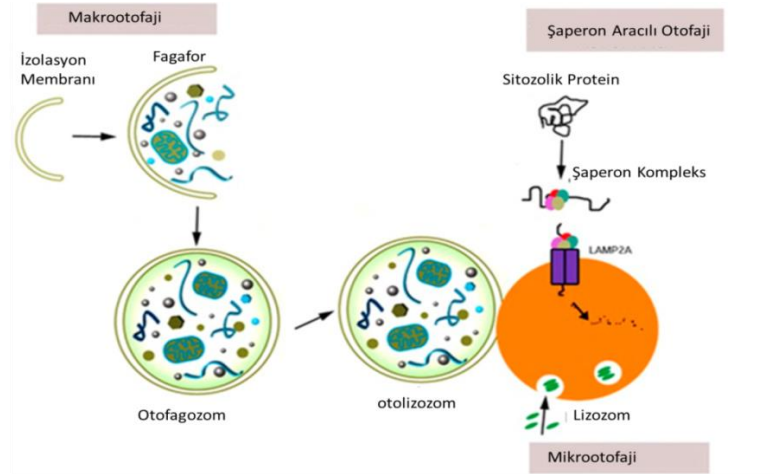
## 2.7. Otofaji

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içerisinde lizozomla birleşerek parçalanmasına sebep olan bir mekanizmadır (Arslan, vd., 2011:1). Otofaji süreci besin sınırlayıcı koşullar altında hücre sağkalımı mekanizması olarak tanımlanmıştır. Özellikle otofajik katabolik aktivite, hücrelerin besin yokluğunda yeterli enerji seviyelerini geri kazanmasını sağlamakta ve sonuç olarak canlılığın artmasını sağlamaktadır. Otofajinin bu özelliği, gelişimsel süreç içerisinde enerji için alternatif bir hücrel kaynak olarak normal metabolizmanın sürdürülmesini sağladığı için önemlidir (Eisenberg-Lerner ve Kimchi, 2009:1).

### 2.7.1. Otofaji Türleri

Otofajinin 3 ana çeşidi vardır;

- 1) Mikrotofaji: sitoplazmik malzemeler doğrudan invajinasyon, çıkıntı, lizozomal veya vakuolar membranın ayrılması yoluyla lizozom veya vakuole geçer (Y. Chen ve Klionsky, 2011:1).
- 2) Şaperon aracılı otofaji (CMA): Mayada olmayan ancak daha yüksek ökaryotlarda karakterize edilen bir işlemdir. Bu otofaji türünde şaperon proteini önce sitosolik hedef substratına daha sonra lizozomal zar üzerindeki bir reseptöre bağlanır. Katlanmamış sitosolik hedef protein daha sonra bozunması için doğrudan lizozom içine taşınır (Y. Chen ve Klionsky, 2011:1).
- 3) Makrotofaji: Makrotofaji, otofajik sürecin ana tipidir ve diğer iki tipten farklıdır. Sitosolik çift membranlı vezikül, otofagosom oluşumu ile karakterizedir. Makrotofaji sırasında, sitoplazmik proteinler, organeller veya diğer materyaller, otofagosomlar oluşturmak üzere genişleyen ve yakın olan fagosomlarla çevrilidir. Bu otofagosomlar, otoizozomlar oluşturmak için lizozomlarla veya vakuollerle birleşir. Elde edilen bozunma ürünleri daha sonra yeniden kullanım için sitozole geri taşınır (Beth Levine ve Guido Kroemer, 2008:13; Y. Chen ve Klionsky, 2011:1; Nikolettou, vd., 2015:2).

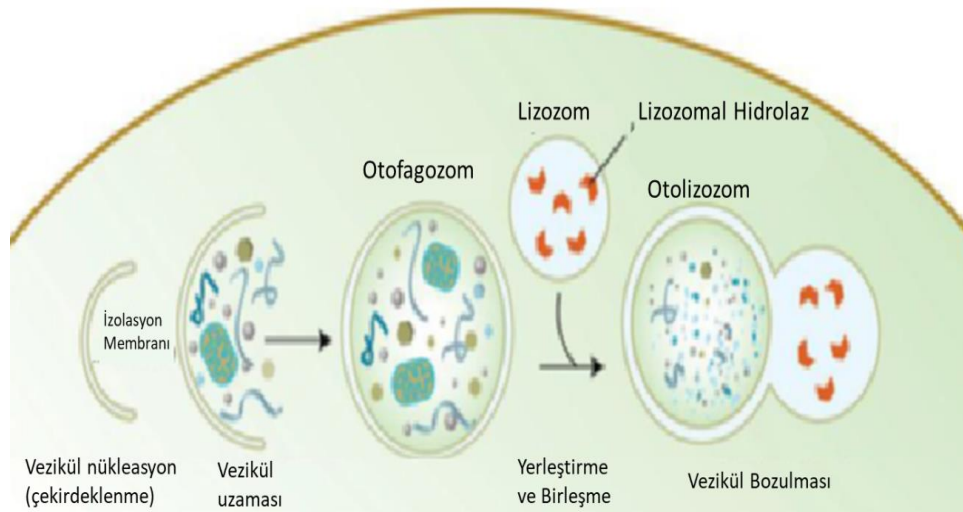


**Şekil 2.10.** Üç tip otofajinin şematik gösterimi

**Kaynak:** (Nikoletopoulou, vd., 2015:2'den değiştirilerek alınmıştır.)

### 2.7.2. Otofajinin Mekanizması

Mayada yapılan çalışmalar sonucunda otofaji mekanizmalarında rol oynayan otofaji ile bağlantılı proteinler (Atg proteinleri) bulunmuştur. Günümüzde 30'dan fazla ATG geni tanımlanmıştır. Atg proteinlerinin bir kısmı ve çeşitli protein kompleksleri otofajik kesecik ve otofagozom oluşumunda rol oynamaktadır. Hücrede otofagozomlar memelilerde endoplazmik retikulum ile golgi yapılarının aralarına serpiştirilmiş olan "otofaji oluşum merkezi" (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen ve yapılarda ortaya çıkmaktadırlar (Arslan, vd., 2011:2).



**Şekil 2.11.** Otofaji basamakları

**Kaynak:** (Meléndez ve Levine, 2009:3'ten değiştirilerek alınmıştır.)

Otofaji aşağıdaki temel adımlara ayrılabilir:

1) Başlatma / indüksiyon;

Hücrede besin varlığında, TOR proteini (target of rapamisin), aktifleşerek otofajiyi uyaran ATG1 (memelilerde ULK1/2), ATG13, ATG17 kompleksinden ULK1/2-ATG13'ü fosforile edilerek kompleksin bozulmasına neden olur ve otofaji inhibe edilir. Besin açlığında ise TOR engellenir, otofajiyi uyaran kompleks bozulmaz ve ULK1/2 kendi kendini, Atg13, FIP200 tarafından fosforillenerek aktifleşmesi ile otofaji tetiklenmiş olur (Y. Chen ve Klionsky, 2011:7; Geng ve Klionsky, 2008:4; Nikolettou, vd., 2015:2).

2) Vezikül nükleasyon (çekirdeklenme);

Memeli hücrelerinde 3 sınıf PI3K (Fosfatidilinositol-3-kinaz) bulunur; sınıf I PI3K otofajinin inhibitörüdür, sınıf II PI3K otofaji ile ilişkili değildir, sınıf III PI3K ise otofajinin aktivatörüdür ve membran oluşumunda görev alır (Y. Chen ve Klionsky, 2011:5; Yang, vd., 2005:5). PI3K aktivasyonu, otofaji sırasında vezikül çekirdeklenmesinde önemli bir adımdır. Aktif hale gelen ULK bileşenleri otofagozomun oluşması için beclin 1 (BECN1), Vps34 (PIK3C3) ve Vps15 genlerinden oluşan sınıf III PI3K kompleksini aktifleştirir. Fosfatidilinositol 3-kinaz kompleksinin aktivasyonu ile Atg proteinlerinin mayada fagofore toplanma bölgesine (PAS) veya memelilerde PAS eşdeğerine alınmasıyla çekirdeklenme başlar (Y. Chen ve Klionsky, 2011:5).

3) Vezikül uzaması;

Vezikül membranının uzaması ve kesecik halini alması; iki übikuitin benzeri konjugasyon sistemi tarafından kontrol edilmektedir (Geng ve Klionsky, 2008). Birinci übikuitin benzeri konjugasyon sisteminde, Atg12 proteininin Atg5 proteinine kovalent olarak bağlanması katalize edilir. İkinci übikuitin benzeri konjugasyon sisteminde ise, Atg8 (Memelilerde MAP-LC3 ya da kısaca LC3 olarak adlandırılmaktadır.) proteini, bir fosfotidiletanolamin (FE) yağ molekülüne kovalent olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın gerçekleşebilmesi için, Atg8 ya da LC3'ün C-ucundaki beş aminoasitin Atg4 proteazı tarafından kesilerek 6. aminoasit olan glisin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Böylelikle FE molekülü açığa çıkan glisine bağlanmaktadır.

Atg8/LC3'ün FE'ye bağlanması, PAS'a zar taşınması ve burada zar uzaması için gerekli bir olaydır (Arslan, vd., 2011:3).

#### 4) Lizozomla birleşme ve yıkım;

Memeli hücrelerinde, otofagosomun lizozom ile füzyonundan önce otofagosomların endozomlar veya endozomdan türetilen veziküller ile kaynaşarak olgunlaşması gerekir. Otofagosom olgunlaşması için mayaya benzer şekilde monomerik GTPazların (Rab22, Rab24) ve SNARE protein ailesi üyelerinin ve NSF proteinin aktivitesi gereklidir. Otofajik vakuollerle ilişkili Rab7 proteininin negatif mutantının aşırı ekspresyonu, otofagosomlar ile geç endozom / lizozomal kompartıman arasındaki füzyonu engeller ve otofagosom birikimine yol açar (Yang, vd., 2005:6). Otofagosom daha sonra geç endozom veya lizozomla birleşir ve böylelikle taşıdığı kargonun parçalanmasına yol açar. Lizozomal enzimler tarafından kargonun (proteinler, organeller vb.) yıkımı sonrasında ortaya çıkan yapıtaşları (örn. aminoasitler, yağ asitleri, vb.) tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılır (Arslan, vd., 2011:3).

### 2.8. Otofajinin Düzenlenmesinde ROS'un Rolü

Reaktif oksijen türleri ve otofaji, insan vücudunda yaygın olarak görülen ve hücrel homeostazı düzenleyen anahtar faktörlerdir. Hücrel homeostazı sürdürmek için ROS ve otofaji koordine olarak çalışmaktadır. Otofaji, ROS tarafından indüklenebilir ve böylelikle hücrelere ve dokulara ROS kaynaklı olarak verilen hasarı engeller (Y. F. Chen, vd., 2017:1).

Hem oksidatif stres hem de otofaji, hücrel stresörlere yanıt olarak hem koruyucu hem de zararlı yollar olarak tanımlanmıştır. Doğrudan redoks bazlı otofajinin düzenlenmesi, LC3-II'nin delipidasyonunu baskılayan Atg4'ün H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından önleyici oksidasyonu sayesinde gerçekleşir. Daha yavaş, daha dolaylı bir şekilde oksidatif stres, Beclin 1 ve LC3'ün transkripsiyonunu da düzenler. Aşırı ROS üretimi üzerine, mitokondri ciddi hasar riski taşır ve kısmen çıkarılması gerekir. Bu, "mitofaji" adı verilen hasarlı mitokondriyal fragmanların seçici otofajik bozulmasıyla meydana gelir (Fang, vd., 2016:1; Van Erp, vd., 2017:5).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

**Tablo 3.1.** Kullanılan cihazlar

<b>Buz Makinesi</b>	<b>(Hoshizaki - FM-80KE)</b>
<b>Buzdolabı (+4 °C)</b>	Regal
<b>Buzdolabı (-20 °C)</b>	Uğur
<b>Buzdolabı (-80 °C)</b>	Panasonic
<b>CO<sub>2</sub>'li İnkübatör</b>	Memmert
<b>Dikey Elektroforez Sistemi</b>	Cleaver
<b>Distile Su Cihazı</b>	Mes
<b>Etüv</b>	Jeio Tech-IB-E
<b>Hassas Terazı</b>	Ohaus
<b>İnvert Mikroskop</b>	Nikon Eclipse TS100-F
<b>Jel Görüntüleme Sistemi</b>	Syngene - G-box
<b>Laminar Flow</b>	Scanlaf - Mars Safety Classe 2
<b>Mikroplaka Okuyucu</b>	Thermo Scientific - Multiscan Go
<b>Neubauer Tip Thoma Lam</b>	Marienfeld Superior
<b>Nanodrop</b>	BioSpec-nano
<b>Otoklav</b>	Nüve Steamart - OT 90L
<b>pH Metre</b>	İnolab - PH 7110
<b>Pipet Seti</b>	Nichiryo/Thermo Scientific
<b>Rotatör</b>	Biosan - Multi Bio RS24
<b>Soğutmalı Santrifüj Cihazı</b>	Thermo Scientific - Micro CL 21R
<b>Santrifüj Cihazı</b>	Nüve - NF 800
<b>Su Banyosu</b>	Nüve- NF 800
<b>Vorteks</b>	Jeio Tech, Lab Companion
<b>Western Transfer Sistemi</b>	HOEFER
<b>Yatay Elektroforez Sistemi</b>	Cleaver

### 3.1.2. Sarf Malzemeler

**Tablo 3.2.** Kullanılan malzemeler

1,5 ml'lik toplama tüpü	Isolab
10 µl'lik pipet ucu	Isolab
10 ml Serolojik Pipet	Euro clone
1000 µl'lik pipet ucu	Isolab
2 ml'lik toplama tüpü	Isolab
200 µl'lik pipet ucu	Isolab
5 ml Serolojik Pipet	Euro clone
50 ml'lik ve 15 ml'lik falkon	Euro clone
6'lı well plate	SPL
96'lı well plate	Biologix
Beher	S&H Labware
Cam Şişe	Isolab
Cryo Tüp	Isolab
Enjektör	Ayset
Erlen	S&H Labware
Filtre 0,22 µM	Sarstedt
Flask (T75) ve Flask (T25)	Thermo Scientific
Mezür	S&H Labware
PVDF Membran	Merk Millopore
Scraper	SPL
Whatman Kağıdı	Biorad

### 3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

**Tablo 3.3.** Kullanılan kimyasallar

<b>100 bp DNA Ladder</b>	GeneDirex
<b>10X TBS/10X TBS-T</b>	CST
<b>2X Laemli</b>	Sigma
<b>6X Loading Dye</b>	Biolabs
<b>Agaroz</b>	Applichem
<b>Akrilamid / Bisakrilamid</b>	Sigma
<b>Amonyum Asetat</b>	Merck Millipore
<b>Amonyum Persülfat</b>	Thermo Scientific
<b>Atg4A antibody</b>	Santa Cruz
<b>Bradford Reagent</b>	Sigma
<b>BSA</b>	Carlo Erba
<b>Color-coded Prestained Protein Marker 11-250 kDA</b>	Cell Signaling Technology
<b>Coommasie Brilliant Blue</b>	Sigma
<b>Cyto-ID Otofaji saptama kiti</b>	Enzo
<b>Dimetilsülfoksit (DMSO)</b>	Merck Millipore
<b>ECL</b>	Thermo Scientific
<b>EDTA</b>	Carlo Erba
<b>FBS</b>	Biological Industries
<b>Fenol klorofom izoamil alkol</b>	Sigma
<b>Glasiyal Asetik Asit</b>	Sigma
<b>H<sub>2</sub>DCFDA Assay Kit</b>	ABP biosciences
<b>HCl</b>	Merck Millipore
<b>İmatinib</b>	
<b>İzopropanol</b>	Merck Millipore
<b>KCl</b>	Merck Millipore

**Tablo 3.3.** Devam ediyor

<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>Merck Millipore</b>
<b>LC3 <math>\alpha/\beta</math> antibody</b>	Santa Cruz
<b>Metanol</b>	Sigma
<b>MTT Reagent (Thiazolyl blue tetrazolium bromide)</b>	Glentham Life Sciences
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Merck Millipore
<b>NaCl</b>	Merck Millipore
<b>Penisilin /Streptomisin</b>	Gibco
<b>PMSF</b>	Cell Signaling Technology
<b>Ponatinib</b>	MCE
<b>Ponceau Red</b>	Merck Millipore
<b>Protein Marker (11-250 kDa)</b>	Invitrogen
<b>Proteinaz K</b>	Sigma
<b>RIPA Tamponu</b>	Cell Signaling Technology
<b>RNase</b>	MACHEREY-NAGEL
<b>RPMI-1640 Besiyeri</b>	Gibco
<b>Sekonder Antikor</b>	CST
<b>Sodyum Dodesil Sülfat</b>	Sigma
<b>TEMED</b>	Tokya Chemical Industry
<b>Tripsin-EDTA</b>	Sigma
<b>Tris-Base</b>	Sigma
<b>Trypan Blue Solüsyonu (%0,4)</b>	Amresco

### 3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

#### **1X PBS tamponu**

Tablo 3.4.'te verilen kimyasallar 800 ml dH<sub>2</sub>O ile çözdürüldükten sonra pH 7,4 ayarlanıp hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklav ile sterilizasyonu sağlanan tampon gerektiğinde kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

**Tablo 3.4.** 1X PBS tampon içeriği

İçerik	Miktar
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24g

**Hücre dondurma ortamı**

0,22 µm boyutundaki filtreden geçirilmiş 9 ml fetal sığır serumu (FBS) ve 1 ml dimetilsülfoksit karıştırılarak hazırlanmıştır.

**Amonyum Asetat: 3M - 10 ml**

2,31 g tartılıp 10 ml suda çözdürülmüş ve sterilizasyonu sağlanmıştır.

**Tris-HCl: pH: 8 - 0,01 M – V=10 ml=0,01 L**

0,0121 g Tris-Base tartılıp dH<sub>2</sub>O'da çözdürülmüştür. pH= 8'e getirilip hacmi 10 ml'ye tamamlanmıştır.

**0,1 M EDTA: pH:8 – V=0,01 L**

0,29 g EDTA dH<sub>2</sub>O'da çözdürülmüştür.

**%10 SDS**

10 g SDS 800 ml distile su ile çözülecek hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**%0,5'lik SDS**

%10'luk SDS'ten seyreltmek için 500 µl alınıp dH<sub>2</sub>O ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

**Lyzis buffer**

Tablo 3.5.'te belirtilen kimyasallar belirtilen miktarlarda karıştırılmıştır.

**Tablo 3.5.** Lyzis buffer içeriği

	10 ml için
<b>10 mM Tris-HCl pH: 8</b>	100 µl
<b>0,1 M EDTA pH:8</b>	2000 µl
<b>%0,5'lik SDS</b>	500 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	7400 µl

**TE buffer**

Tablo 3.6'da belirtilen kimyasallar belirtilen miktarlarda karıştırılarak otoklavlanmıştır.

**Tablo 3.6.** TE buffer içeriği

<b>1 M tris pH:8</b>	<b>2 ml</b>
<b>EDTA pH:8</b>	0,4 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	200 ml'ye tamamlanır

**50X TAE**

Tablo 3.7.'de belirtilen kimyasallar belirtilen miktarlarda karıştırılmıştır.

**Tablo 3.7.** 50X TAE içeriği

<b>Tris-Base</b>	<b>242 g</b>
<b>Glasiyal Asetik Asit</b>	57,1 ml
<b>0,5 M EDTA</b>	100 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1000 ml'ye tamamlanır.

**1X TAE**

20 ml 50X TAE'den alınıp dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**%3'lük agaroz jel**

3 g agaroz + 100 ml 1X TAE mikrodalgada eriyene kadar ısıtılmış ve 3 µl EtBr eklenmiştir.

**1X RIPA tamponu**

10X RIPA tampondan 100 µl alınıp, 900 µl distile su ile 1000 µl'ye tamamlanmıştır. 1 ml RIPA tamponu içerisine 5 µl PMSF eklenmiştir.

**%10 APS**

0,1 g Amonyum persülfat 1 ml distile su ile çözündürülmüştür.

**1,5 M Tris-HCl**

27,23 g Tris 80 ml distile su ile çözülmüş, pH 8,8'e ayarlandıktan sonra hacmi 150 ml'ye tamamlanmıştır.

**0,5 M Tris-HCl**

6 g Tris 80 ml distile su ile çözülür, pH 6,8'e ayarlandıktan sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

**SDS poliakrilamid jel**

Tablo 3.8.'de verilen bileşenlerden belirtilen miktarda tartılarak 2 adet jel hazırlanmıştır.

**Tablo 3.8.** SDS poliakrilamid jel içeriği

İçerik	%10'luk Seperating (ayırma) jel	%15'lik Seperating (ayırma) jel	%4'lük Stacking (yükleme) Jel
Su	4,1 ml	7,4 ml	3,075 ml
Tris-HCl	2,5 ml - pH: 8.8 – 1,5 M	1,88 ml - pH: 8.8 – 3 M	1,25 ml - pH:6,8 – 0,5 M
SDS	0,1 ml (%10'luk)	0,075 ml (%20'lik)	0,05 ml (%10'luk)
APS	0,075 ml	0,075 ml	0,04 ml
TEMED	0,008 ml	0,015 ml	0,001 ml
Akrilamid/ Bisakrilamid	3,3 ml (%30'luk)	5,6 ml (%40'lık)	0,67 ml (%30'luk)

**IX Tris-Glisin-SDS yürütme tamponu**

Cell Signaling Technology marka 10X Tris-Gilisin-SDS yürütme tamponundan 100 ml alınıp 900 ml dH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır.

### **10X Towbin transfer tamponu**

Tablo 3.9’da verilenler tartılarak bir miktar suda çözdürülerek pH: 8,3 olarak ayarlanmış ve 1000 ml’ye tamamlanmıştır.

**Tablo 3.9.** 10X Towbin transfer tamponu içeriği

<b>Tris</b>	30,25 g
<b>Glisin</b>	144 g
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1000 ml’ye tamamlanır.

### **1X Towbin transfer tamponu**

10X Towbin Transfer tamponundan 100 ml alınarak toplam hacmin %20si metanol dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml’ye tamamlanmıştır.

### **%5 Süt**

5 g non-fat dry milk, 100 ml TBS-Tween 20 tamponu ile çözülmüştür.

### **10X TBS tamponu**

86,6 g NaCl ve 12,11 g Tris-Baz tartılarak 800 ml distile su ile çözüldükten sonra pH 8,8’e ayarlanmış ve hacmi 1000 ml’ye tamamlanmıştır.

### **1X TBS tamponu**

10X TBS tamponundan 100 ml alınıp, 900 ml distile su ile 1000 ml’ye tamamlanmıştır.

### **1X TBS-Tween 20 tamponu**

Cell Signaling Technology marka 10X TBS-Tween 20 tampondan 100 ml alınıp, 900 ml distile su ile 1000 ml’ye tamamlanmıştır.

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Kullanılan Hücre Hatları**

#### **K562R lösemik hücre hattı**

Bu çalışmada K562 hücrelerinin birinci nesil trozin kinaz inhibitörü imatinibe karşı 1  $\mu$ M direnç kazandırılmış formu olan K562R hücre hattı kullanılmıştır. K562R hücre hattı özellikleri Tablo 3.10.’da özetlenmiştir.

**Tablo 3.10. K562R Hücre Hattı Özellikleri**

Organizma	İnsan
Doku	Kemik İliği
Morfoloji	Hematopoetik
Büyüme Özellikleri	Süspansiyon
Hastalık	Kronik Myeloid Lösemi
Yaş	53
Cinsiyet	Kadın

**K562S lösemik hücre hattı**

Bu çalışmada kullanılan K562S hücre hattı terminal blastik kriz döneminde olan kadın hastadan türetilen eritroid-miyeloid öncü hücre dizisidir. Hücre hattı özellikleri Tablo 3.11.'de özetlenmiştir.

**Tablo 3.11. K562S Hücre Hattı Özellikleri**

Organizma	İnsan
Doku	Kemik İliği
Morfoloji	Hematopoetik
Büyüme Özellikleri	Süspansiyon
Hastalık	Kronik Myeloid Lösemi
Yaş	53
Cinsiyet	Kadın

**Hücre hattında kullanılan besiyeri ve kültür özellikleri**

1X 500 ml RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) besi ortamı içerisine 2 mM konsantrasyonda L glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve % 10 oranında FBS eklenmiştir. Gerektiğinde kullanmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

**3.2.2. Kullanılan Kemoterapötik İlaçların Hazırlanması****K562R hücre hattı besiyeri ortamına eklenen imatinibin hazırlanması**

10 mM ana stoktan 150 µl alınıp üzeri 1350 µl DMSO ile tamamlanarak 1 mM stok hazırlanmıştır. 1 mM'lık stok gerektiğinde kullanmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

### **İmatinib etken maddesinin hazırlanması**

1 mM ana stoktan 150 µl alınıp üzeri 1350 µl DMSO ile tamamlanarak 100 µM stok hazırlanmıştır. 100 µM'lık stok gerektiğinde kullanmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

### **Ponatinib etken maddesinin hazırlanması**

Moleküler ağırlığı 532,56 g/mol olan ponatinib son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 1 mg Ponatinib 1877 µl DMSO içinde çözülmüştür. 1 mM konsantrasyondaki çözeltilerden 1 µl alınıp 999 µl DMSO eklenerek 1 µM'lık çalışma stoğu hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler gerektiğinde kullanmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

### **Sığıla yağı (sweetgum oil) etken maddesinin hazırlanması**

0,1 g sıgla yağı tartılarak 100 µl DMSO içerisinde çözdürülerek 1 g/ml ana stok hazırlanmıştır. Deneylerde kullanmak üzere 1 g/ml ana stoktan 30 µl alınıp üzerine 9970 µl DMSO eklenerek 3000 µg/ml çalışma stoğu hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler gerektiğinde kullanmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

### **3.2.3. Hücre Kültürü**

Deneylerde kullanılmak üzere K562R hücreleri 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde T-25 ve T-75 flasklarda, 2 mM konsantrasyonda L glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve %10 oranında FBS içeren RPMI besiyerinde çoğaltılmıştır.

K562R hücreleri çoğaltılıp yedeklendikten sonra total 1 µM imatinib eklenerek 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde T-25 ve T-75 flasklarda 2 mM konsantrasyonda L glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve %10 oranında FBS içeren RPMI besiyerinde kültürlerine devam edilmiştir.

K562S hücreleri 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde T-25 ve T-75 flasklarda, 2 mM konsantrasyonda L glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve %10 oranında FBS içeren RPMI besiyerinde çoğaltılmıştır.

### **K562R ve K562S hücre hatlarının pasajlanması**

T-25 ve T-75 flasklarda bulunan K562R ve K562S hücreleri 15 ml'lik toplama tüpüne alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Pellet 1 ml PBS ile çözdürülüp yeniden 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Pelet üzerine T-25 flasklar için 4 ml, T-75 flasklar için 7 ml besiyeri ve K562R hücreleri için flasktaki son molarite 1  $\mu$ M olacak şekilde eklenerek 37<sup>0</sup>C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kültürleri gerçekleştirilmiştir.

Ancak K562R hücre hattının İmatinib'e maruz bırakıldığı süreçte, yapışma özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Önce süspansen olan hücreler tamamen toplanmış daha sonra yapışan hücreler Tripsin/EDTA ile inkübe edilerek hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Yüzeyden ayrılan hücreler süspansen hücrelerin toplandığı 15 ml'lik toplama tüpüne alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Pellet 1 ml PBS ile çözdürülüp yeniden 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Pelet üzerine T-25 flasklar için 4 ml, T-75 flasklar için 7 ml besiyeri ve total 1  $\mu$ M imatinib eklenerek 37<sup>0</sup>C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kültürlerine devam edilmiştir.

### **K562R ve K562S hücre hatlarının dondurulması**

K562R ve K562S hücreleri 15 ml'lik toplama tüpüne alınarak 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Pelet üzerine 1 ml freezing media (%90 FBS + %10 DMSO) eklenerek cryotüpe alınmış ve -80<sup>0</sup>C'ye kaldırılmıştır.

### **Dondurulmuş hücre hatlarının çözülmesi**

Cryotüpteki hücreler -80<sup>0</sup>C'den alınarak elde ısıtılmış ve çözülmesi sağlanmıştır. 15 ml'lik toplama tüpüne 2 ml besiyeri üzerine alınan hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant 1 ml kalana kadar atılmıştır. Kalan 1 ml süpernatant T-25 flaska alınmış ve üzerine 3 ml besiyeri eklenmiştir. Pelet üzerine 1 ml besiyeri eklenerek 3500  $\mu$ l besiyeri eklenmiş iki adet T-25 flaska her ikisine de 500  $\mu$ l olarak ekim yapılmıştır. Flaskların 37<sup>0</sup>C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kültürleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.4. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi (Tripan Mavisi Canlılık Testi)

Hücre canlılığının değerlendirilmesi için tripan mavisi canlılık testi yapılmıştır. Bu testte 6-well'de her kuyucuğa ekilmiş 200000 hücrenin imatinibin 0,01 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M, 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M dozlarında canlılığı gözlenmiştir. Çalışmalar ilaç dozu uygulanmamış kontrol grupları varlığında yürütülmüştür. Test aşamaları aşağıda belirtildiği gibidir.

1. 6-well'e her kuyucuğa  $2 \times 10^5$  hücre belirtilen dozlarda imatinib içeren ortamlarda ekilmiştir. 24 ve 48. saatler için iki deney kurulmuştur.
2. 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda her kuyucuktaki hücreler 1,5 ml'lik toplama tüpüne toplanarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır.
3. Pelletler üzerine 50  $\mu$ l besiyeri ve 50  $\mu$ l tripan blue boyası eklenerek pipetaj yapılmıştır.
4. Karışımdan 10  $\mu$ l alınarak thoma lamında sayım yapılmıştır. Canlı hücreler parlak ve temiz bir sitoplazmaya sahip olarak görülürken, ölü hücreler ise mavi sitoplazmalı olarak görülmektedir.
5. 1 ml ortamdaki canlı hücre sayısı = 1 büyük karede sayılan canlı hücre x dilüsyon faktörü x  $10^4$  formülü ile belirlenmiştir. (1ml'deki ölü hücre sayısı da aynı şekilde hesaplanmıştır.)
6. Canlı hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı hesaplanarak canlılık yüzdesi hesaplanmıştır.

### 3.2.5. Sitotoksikite Çalışmaları

İmatinib, ponatinib ve sıgla yağı etken maddelerinin hücreler üzerindeki sitotoksik konsantrasyonlarını saptamak amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT testi, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testidir. Mitokondrideki aktivitelerine göre proliferasyon olmuş hücrelerde mitokondriyal süksinat dehidrojenaz artışı gözlemlenmektedir. Mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enziminin tetrazolyum boyası ile verdiği reaksiyon sonucunda tetrazolyum halkası parçalanmakta ve soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir.

MTT testi, oluşan mor renkte ve suda çözünmeyen formazan kristallerinin uygun bir çözücüde çözülerek absorbansının ölçümü esasına dayanan bir testtir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır.

Hücre hattı üzerinde imatinib, ponatinib ve sweetgum oil etkin dozlarını belirlemek amacı ile aşağıdaki protokol izlenmiştir.

1. 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna  $2 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 100 µl hücre, besiyeri ve etken maddelerin farklı dozları karışımıyla ekim yapılmıştır.
2. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda her kuyucuğa 10 µl MTT ajanı 5 mg/ml konsantrasyonda eklenerek 4 saat 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edilmiştir.
3. 4 saat inkübasyon sonucunda 100 µl DMSO eklenerek 5 dk karanlıkta bekletilmiştir.
4. Son olarak ELISA Reader'da 595 nm dalga boyunda ölçümü yapılmıştır.
5. İlaç uygulanmayan kontrol grubu hücrelerin absorbans değeri %100 canlılık olarak kabul edilmiştir ve diğer hücre gruplarındaki canlılık yüzdesi bu değer üzerinden hesaplanmıştır.

İlaçların farklı konsantrasyonlarına 24, 48 ve 72. Saat inkübasyondan sonra 595 nm'de bakılmış en optimum sonuçların 24. saatte olduğu ve zaman arttıkça ilaçların etkisinin arttığı gözlenmiştir.

### **Kombine İlaç Uygulaması**

Kombine uygulaması K562R hücre hattında sığla yağının 150µg/ml'de sabit tutulup ponatinibin IC<sub>50</sub> değerlerinin 1/12, 1/11,5, 1/11, 1/10,5, 1/10, 1/9,5, 1/9, 1/8,5, 1/8, 1/7,5, 1/7, 1/6,5 1/6, 1/5,5, 1/5, ¼,5, 1/4, 1/3,5, 1/3, ½,5, 1/2, 1/1,5, 1/1 şeklinde oranlanmasıyla uygulanmıştır. K562S hücre hattında ise sığla yağı 150 µg/ml'de sabit tutulup imatinibin artan dozlarıyla kombine oluşturulmuştur.

### **3.2.6. ROS Tespiti**

ABP ROS Assay Kit ile ROS tespiti yapılmıştır. Kit prosedürü uygulanmıştır.

1.  $10^5$  hücre/ml kimyasallarla inkübe edilmiş ve ROS indüklenmiştir.

2. İndükleyici bir ajan olmaksızın negatif kontrol hazırlanmıştır.
3. Pozitif kontrol için 496,8 µL PBS içerisine 3,2 µL %70 TBHP (Component B) ekleyerek 50 mM TBHP stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra ml başına 4 µL 50 mM TBHP stok çözeltisinden eklenerek son konsantrasyon 200 µM olacak şekilde ayarlanır ve 30 – 60 dk normal büyüme koşullarında inkübe edilmiştir.
4. Şişeyi açmadan önce H<sub>2</sub>DCFDA'nın (Component A) şişesi kısa süre santrifüj edilmiştir.
5. 10 µM boya nihai çalışma konsantrasyonu sağlamak için H<sub>2</sub>DCFDA stok solüsyonu (Component A) önceden ısıtılmış tamponda (HBSS veya HEPES) 1:1000 oranında seyreltilmiştir.
6. Santrifüjleme ve pipetaj ile hücreler büyüme ortamından ayrılır ve 10 µM H<sub>2</sub>DCFDA stok solüsyonu ile yeniden süspanse edilmiştir.
7. 10-30 dakika boyunca hücreler 37 ° C'de inkübe edilmiştir.
8. Yükleme tamponu çıkarılır ve hücreler önceden ısıtılmış tamponla (HBSS veya HEPES) üç kez yıkanmıştır.
9. Hücreler önceden ısıtılmış büyüme ortamına geri döndürülür ve hücresel esterazların asetat gruplarını hidrolize etmesi ve boyayı oksidasyona duyarlı hale getirmesi için 37°C'de 10-20 dakika inkübe edilmiştir.
10. Floresan mikroskobu ile hemen gözlemlenmiştir.

### 3.2.7. DNA Hasarının Belirlenmesi

DNA hasarının belirlenmesi için DNA Laddering deneyi yapılmış ve aşağıdaki prosedür izlenmiştir.

1. MTT testi ile belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinde konsantrasyonlarda K562R hücreleri için ponatinib, sıgla yağı ve kombine dozu K562S hücreleri için imatinib, sıgla yağı ve kombine dozu uygulanmış hücreler 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bir flaska ilaç uygulanmamış ve kontrol grubu olarak kullanılmıştır.
2. İnkübasyondan sonra flasklardan medyalar 1,5 ml toplama tüpüne toplanıp 13200g'de 4<sup>0</sup>C'de 5 dk santrifüj edilmiş ve supernatant atılmıştır.
3. Flasklar 2 defa 1,5 ml 1 defa 1 ml PBS ile yıkanmış, kazanmış ve aynı toplama tüpüne toplanarak 13200 g'de 2 dk santrifüj edilmiştir.

4. Supernatant atıldıktan sonra pellet üzerine 600 µl Lyzis Buffer eklenerek 1 saat buzda beklenmiştir.
5. 1 saat bekledikten sonra 13200g'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
6. Üst faz yeni toplama tüpüne alınarak 5 µl RNase ve 4 µl Proteinaz K eklenerek 37<sup>0</sup>C'de 1 saat beklenmiştir.
7. Hacim belirlenmiş ve 1:1 oranında fenolklorofom eklenmiştir.
8. 13200 g'de 15 dk santrifüj yapılmıştır.
9. Supernatant yeni toplama tüpüne alınarak hacmin 1/10'u kadar 3M Amonyum asetat pH:5.2 ve hacmin 2 katı kadar absolute etanol eklenmiştir.
10. -20<sup>0</sup>C'de overnight bekletildikten sonra 13200 g'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
11. Etanol kuruduktan sonra pellet 25 µl TE içerisinde çözdürülmüştür.
12. %3'lük 150 ml hazırlanan agaroz jelde 1:5 oranında karıştırılan DNA örneği ve loading dye 70V'ta 120 dk yürütülmüştür.

DNA hasarının belirlenmesi için Hoecsht (33342) boyama yapılmış ve aşağıdaki prosedür izlenmiştir.

1. Hücreler 1x10<sup>6</sup> hücre/ml'yi aşmayacak şekilde kültürlenmiştir.
2. Hücrelere test reaktifleri uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
3. Daha sonra hücreler ortamdan ayrılmış ve 2 kez 1X assay buffer ile yıkanmıştır.
4. Supernatant atılarak 100 µl Hoecsht (33342) boyası ile süspanse edilmiştir.
5. 30 dakika 37 <sup>0</sup>C'de inkübe edildikten sonra 1X assay buffer ile yıkanmıştır.
6. 100 µl 1X assay buffer ile süspanse edilmiştir.
7. 1 lam üzerine 1 damla hücre süspansiyonu uygulanıp lamel ile kapatılarak floresan mikroskopta görüntü alınmıştır.

### 3.2.8. Otofaji Belirlenmesi

Otofaji belirlenmesi amacıyla CYTO-ID Autophagy Detection Kit kullanılmıştır. Deneyde kit prosedürü izlenmiştir.

1. Hücreler 1x10<sup>6</sup> hücre/ml'yi aşmayacak şekilde kültürlenmiştir.
2. Santrifüj ile hücreler toplanmıştır ve hücrelere test reaktifleri ile pozitif ve negatif kontroller uygulanmıştır.
3. 24 saat inkübasyondan sonra hücreler ortamdan ayrılmış ve 2 kez 1X assay buffer ile yıkanmıştır.

4. Supernatant atılarak 100 µl microscopy dual detection reagent ile süspanse edilmiştir.
5. 30 dakika 37 °C’de inkübe edilmiştir.
6. Hücreler 1X assay buffer ile yıkanmıştır.
7. 100 µl 1X assay buffer ile süspanse edilmiştir.
8. 1 lam üzerine 1 damla hücre süspansiyonu uygulanıp lamel ile kapatılarak floresan mikroskopta görüntü alınmıştır.

### **3.2.9. İmmünblotlama Yöntemi**

#### **Protein İzolasyonu**

1. MTT testi ile belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinde konsantrasyonlarda ilaç uygulanıp 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Birer flaska ilaç uygulanmamış ve kontrol grubu olarak kullanılmıştır.
2. İnkübasyondan sonra flasklardan besiyerleri toplama tüpüne toplanıp 13200 g’de 4°C’de 5 dk santrifüj edilmiş ve supernatant atılmıştır.
3. Flasklar 2 defa 1,5 ml ve 1 defa 1 ml PBS ile yıkanmış, kazınmış ve aynı toplama tüpüne toplanarak 13200 rpm’de 2 dk santrifüj edilmiştir.
4. Pellet, içerisine PMSF eklenmiş RIPA Buffer ile çözdürülmüştür.
5. 5 dk buzda ve 15 dk shakerda oda sıcaklığında bekletilmiştir.
6. 14000 g’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
7. Süpernatant yeni toplama tüpüne alındıktan sonra -80 °C’ye kaldırılmıştır.

#### **Bradford analizi ile protein miktar tayini**

Protein izolasyonundan sonra elde edilen proteinlerin konsantrasyonları Bradford analiziyle ölçülmüştür. Standartı bilinen bir proteinin konsantrasyonunu bulmak için doğrunun eğiminden faydalanılmıştır. Bu doğrultuda aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

1. 96’lık well plate’e 3 tekrarlı olacak şekilde BSA’nın artan miktarları eklenmiştir (1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl ve 5 µl )
2. Protein örneklerinden de 3 tekrarlı olacak şekilde 1’er µl eklenmiştir.
3. BSA ve protein örneklerinin yüklü olduğu tüm kuyucuklara 200 µl Bradford Reagent eklenmiştir.

4. 5 dk karanlıkta bekledikten sonra 595 nm’de ölçüm alınmıştır.

### **Protein örneklerinin hazırlanması**

Bradford testi ile protein konsantrasyonları belirlenen hücre lizatlarından her bir protein örneğinin eşit miktarda protein içermesi için gerekli miktarda örnek yeni birer toplama tüpüne alınmıştır. Her toplama tüpüne 1:1 oranında olacak şekilde 2X laemmlerli tamponu eklenerek pipetaj yapılmış ve 95 C°’de 5 dakika inkübe edilerek proteinler denatüre edilmiştir. Denatürasyondan sonra örnekler buz üzerine alınmıştır.

### **SDS jel elektroforezi**

Proteinlerin elektrik akımı yardımıyla molekül ağırlıklarına göre ayrıştırıldığı bir yöntemdir. Aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

1. %10’luk ve %15’lik ayırma jelleri hazırlanıp iki cam arasına dökülmüştür. Jel yüzeyinin düzgün donması için üzerine izopropanol eklenmiş ve 30 dakika boyunca jelin polimerleşmesi için beklenmiştir.
2. Jel donduktan sonra izopropanol dökülüp distile su ile izopropanol tamamen ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Üzerine %4’lük yükleme jeli dökülmüş ve yükleme kuyuları oluşturması için tarak yerleştirilmiştir. 30 dakika boyunca jelin polimerleşmesi için beklenmiştir.
3. 1 µl protein markerı ve protein örnekleri belirlenen kuyulara eklenmiştir.
4. Elektroforez tankı 1X Tris-Glisin-SDS yürütme tamponu ile doldurulmuştur.
5. 80V’da 70 dakika elektrik akımı uygulanarak protein markerı ve protein örneklerinin yükleme jelinden ayırma jeline geçmesi beklenmiştir. Tüm örnekler ayırma jeline geçtikten sonra 120V’da 2,5 saat elektrik akımı uygulanmıştır.

### **Jelden membrana transfer**

Jel üzerinde molekül ağırlıklarına göre sıralanan proteinlerin istenen proteinin varlığını gösterebilmek amacıyla elektrik akımı yardımıyla membrana geçirilmesidir. Aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

1. Jel büyüklüğünde PVDF membran kağıdı kesilmiştir.
2. Membran önce metanol ile ıslatılarak aktivasyonu sağlanmış, sonra 1X towbin transfer tamponu ile ıslatılmıştır. Blot kağıtları da 1X towbin transfer tamponu ile ıslatılmıştır.

3. Cihazın transfer yüzeyi üzerine sırasıyla; blot kağıtları, membran, jel ve tekrar blot kağıtları yerleştirilmiştir.
4. Oluşabilecek hava kabarcıklarını yok etmek amacıyla katlı yapının her katında silindir yardımıyla birkaç kez bası uygulanmıştır.
5. 30V'da 60 dakika transfer işlemi yapılmıştır.

### **Primer ve seconder antikor işaretlemeleri**

Spesifik antikorlar yardımıyla membran üzerinde aranan proteinin gösterilmesi için primer ve seconder antikor işaretlemeleri yapılır. Membrana transfer işlemi gerçekleştikten sonra membranlara %5 süt içeren TBS-T içerisinde 1 saat bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

1. Membranlar %5'lik süt içerisine 1:500 olarak hazırlanan primer antikor içerisine alınarak 24 saat boyunca +4 °C'de rotatorda çevrilmiştir.
2. 24 saat sonunda membranlar 3'er kez 5 dk TBS-T ile yıkanarak %5'lik süt içerisine 1:5000 olarak hazırlanan seconder antikor içerisine alınmış ve 24 saat +4°C'de rotatorda çevrilmiştir.
3. 24 saat seconder antikor içerisinde bekleyen membranlar 3'er kez 10 dk TBS-T ile ve 1'er kez de TBS ile yıkandıktan sonra lüminesans oluşturması için ECL ile muamele edilerek aranan proteine ait ışımalar görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.
4. Bant yoğunlukları ImageJ programı ile hesaplanarak analiz edilmiştir.

### **3.2.10. İstatistiksel Analiz**

Elde edilen veriler en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Veriler Image J programı ile analiz edilmiştir. Karşılaştırmalarda bağımsız T-Testi kullanılmıştır.

## 4. ANALİZ VE BULGULAR

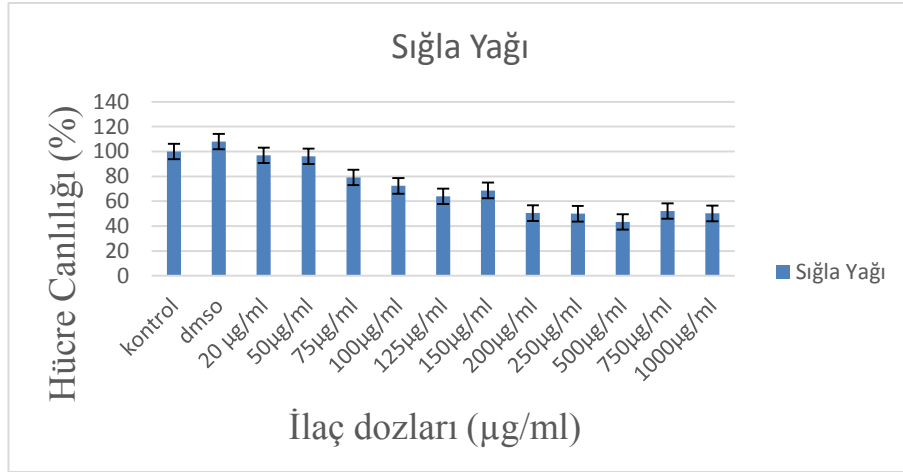
### 4.1. Ara Rapor Döneminde Yapılan Çalışmalar

1. Proje ile ilgili literatür taramasına devam edilmiştir.
2. Bu proje için gerekli olan malzemelerin alınması için gerekli firmalarla görüşülüp proformaların revizyonu gerçekleştirilmiş ve en uygun teklifi veren firmadan projede kullanılacak olan malzemeler temin edilmiştir.
3. Hücre kültürü çalışmalarında hücreler çoğaltılıp yedeklenmesi yapılmıştır.
4. Dirençli hücre hattında besiyerine eklenmesi gereken imatinib miktarını belirlemek amacıyla tripan blue canlılık testi yapılmıştır.

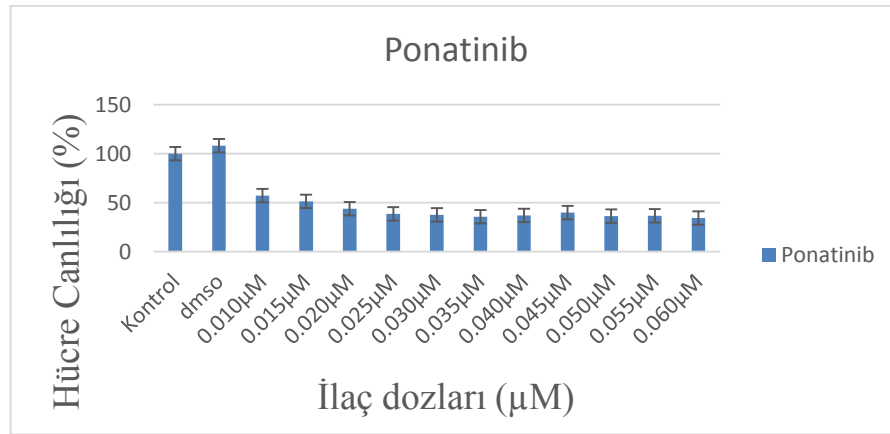
Deney sonucunda hücre büyüme ortamına 1  $\mu\text{M}$  imatinib eklenmesine karar verilmiştir.

5. K562R hücre hattında Ponatinib ve sweetgum oil için sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

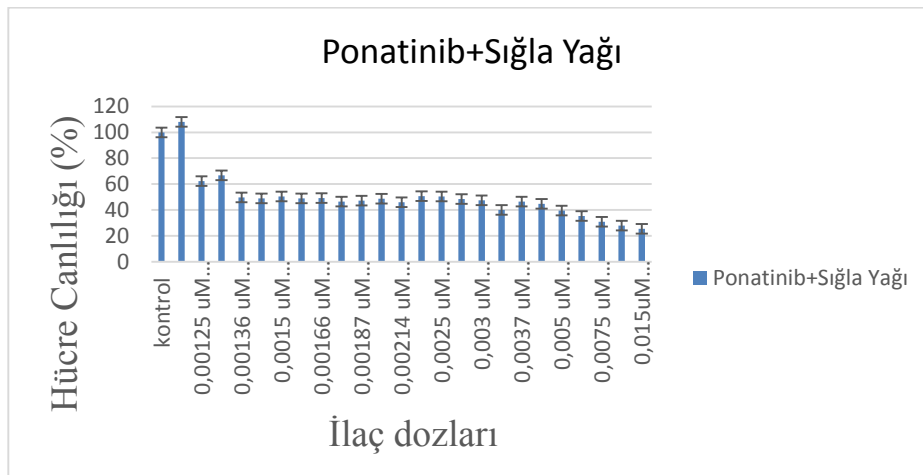
Ponatinib  $\text{IC}_{50}$  değeri 24 saat inkübasyon sonucunda 0.015  $\mu\text{M}$  olarak, sweetgum oil  $\text{IC}_{50}$  değeri 24 saat inkübasyon sonucunda 250  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir. Kombinasyon analizlerinde ise imatinib içeren büyüme ortamında  $\text{IC}_{50}$  değeri 0,0015  $\mu\text{M}$  Ponatinib + 150  $\mu\text{g/ml}$  sweetgum oil olarak, imatinib içermeyen büyüme ortamında  $\text{IC}_{50}$  değeri 0,0037  $\mu\text{M}$  Ponatinib + 150  $\mu\text{g/ml}$  sweetgum oil olarak belirlenmiş ve ilerleyen deneylerde belirlenen dozlar uygulanmıştır.  $\text{IC}_{50}$  değerlerini gösteren grafikler Şekil 3.1., Şekil 3.2., Şekil 3.3., Şekil 3.4.'te verilmiştir.



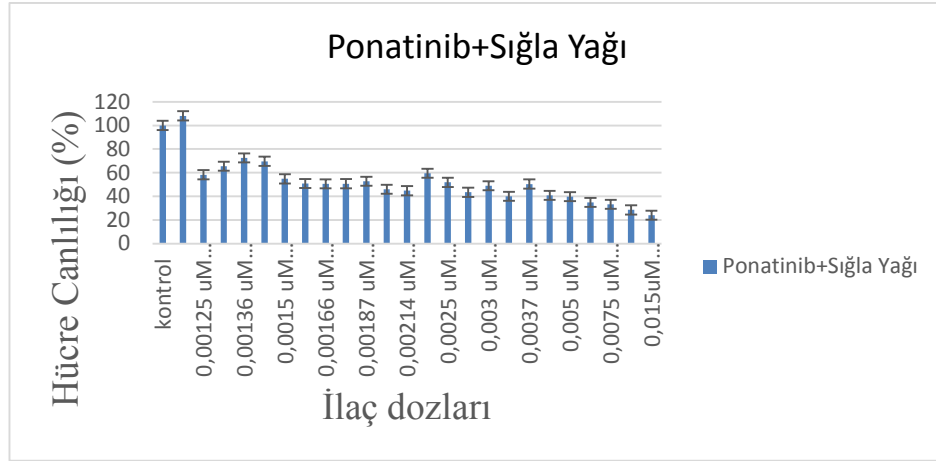
Şekil 4.1. K562R hücre hattında sıgla yağı MTT sonuçları (IC<sub>50</sub> değeri 250 µg/ml)



Şekil 4.2. K562R hücre hattında ponatinib MTT sonuçları (IC<sub>50</sub> değeri 0,015 µM)



Şekil 4.3. 1 µM imatinib eklenmiş büyüme ortamında ponatinib ve sıgla yağı kombine MTT sonuçları (IC<sub>50</sub> değeri 0,0015 µM Ponatinib + 150 µg/ml sıgla yağı)



**Şekil 4.4.** İmatinib eklenmemiş büyüme ortamında ponatinib ve sığıla yağı kombine MTT sonuçları (IC<sub>50</sub> değeri 0,0037  $\mu$ M Ponatinib + 150  $\mu$ g/ml sığıla yağı)

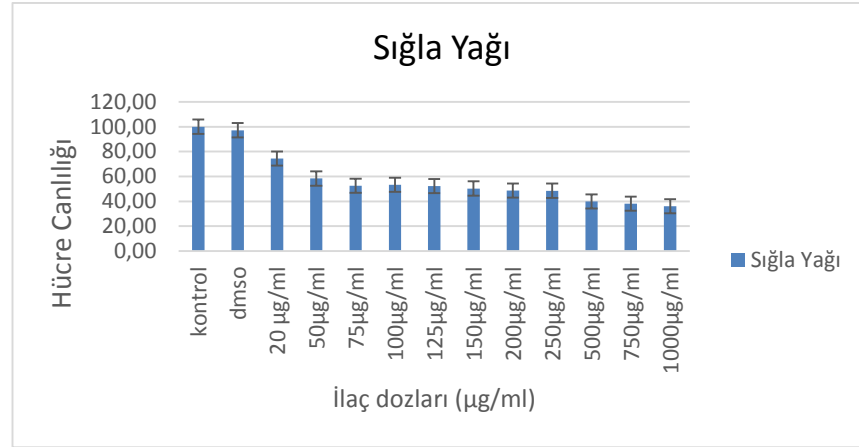
#### 4.2. Sonuç Raporu Döneminde Yapılan Çalışmalar

1. K562S hücre hattında imatinib ve sweetgum oil için sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

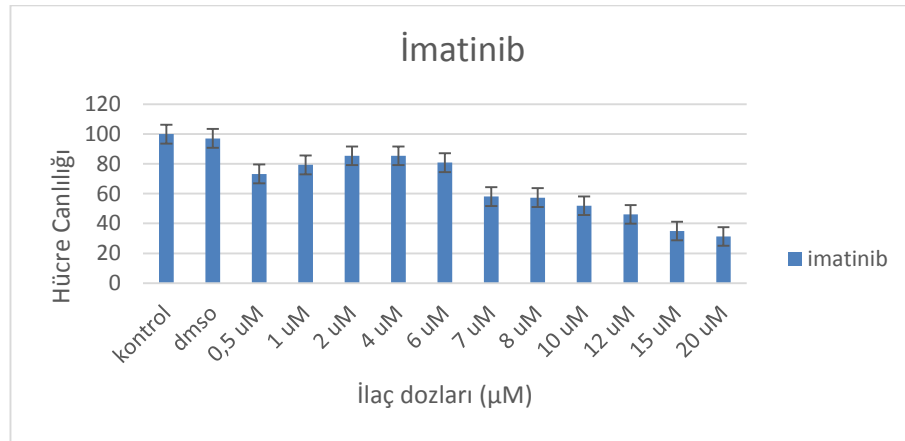
3000  $\mu$ g/ml sweetgum oil çözeltisi K562S hücrelerine 20 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 75 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 125 $\mu$ g/ml, 150 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml, 250 $\mu$ g/ml, 500 $\mu$ g/ml, 750 $\mu$ g/ml, 1000 $\mu$ g/ml dozlarında uygulanmıştır. Çalışmalar ilaç dozu uygulanmamış kontrol grupları varlığında yürütülmüştür. Sweetgum oil IC<sub>50</sub> değeri 24 saat inkübasyon sonucunda 150  $\mu$ g/ml olarak belirlenmiştir. Sweetgum oil IC<sub>50</sub> değeri Şekil 3.5.'de gösterilmiştir.

100  $\mu$ M imatinib çözeltisi K562S hücrelerine 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 6  $\mu$ M, 7  $\mu$ M, 8  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 12  $\mu$ M, 15  $\mu$ M ve 20  $\mu$ M dozlarında uygulanmıştır. Çalışmalar ilaç dozu uygulanmamış kontrol grupları varlığında yürütülmüştür. İmatinib IC<sub>50</sub> değeri 24 saat inkübasyon sonucunda 10  $\mu$ M olarak belirlenmiştir. İmatinib IC<sub>50</sub> değeri Şekil 3.6.'da gösterilmiştir.

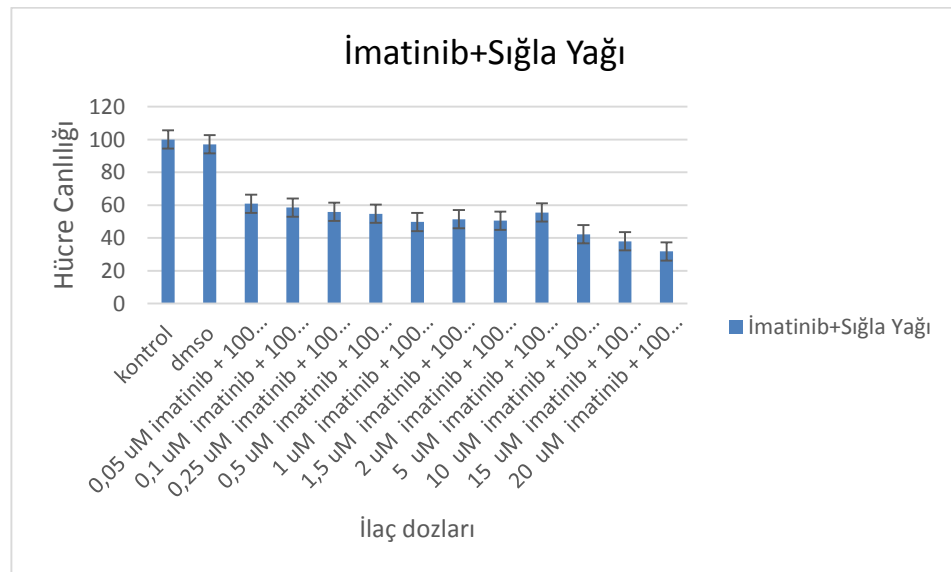
Sweetgum oil miktarını 100  $\mu$ g/ml sabit tutup imatinibin farklı dozlarını deneğimizde IC<sub>50</sub> değeri 2  $\mu$ M imatinib + 100  $\mu$ g/ml Sweetgum Oil olarak bulunmuştur. IC<sub>50</sub> değeri Şekil 3.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. K562S hücre hattında sweetgum oil MTT sonuçları (IC50 değeri 150 µg/ml)



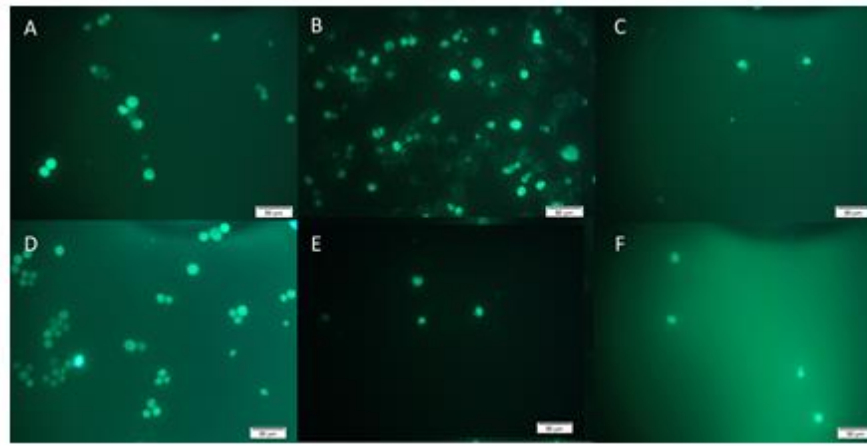
Şekil 4.6. K562S hücre hattında imatinib MTT sonuçları (IC50 değeri 10 µM)



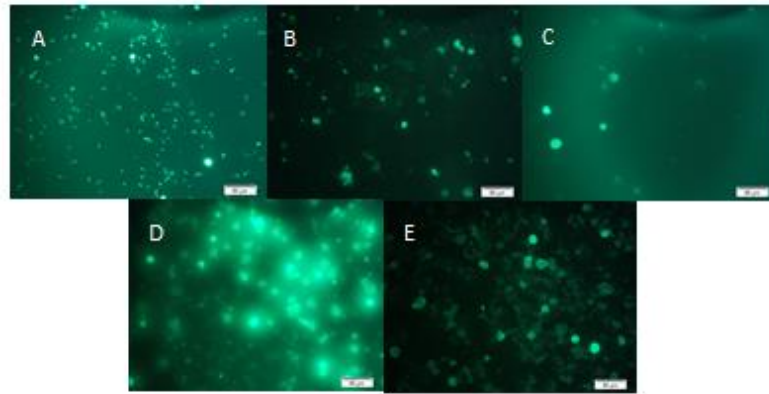
Şekil 4.7. K562S hücre hattında imatinib ve sweetgum oil kombine MTT sonuçları (IC50 değeri 2 µM imatinib + 100 µg/ml Sweetgum Oil)

## 2. DCFH-DA yöntemi ile floresan mikroskopta ROS tespiti yapılmıştır

K562R ve K562S hücrelerine belirlenen dozlarda imatinib, ponatinib ve sweetgum oil uygulamasının ardından 24 saat sonra floresan mikroskop ile görüntülenmiştir. K562R hücre hattında ponatinib uygulanmış hücrelerde reaktif oksijen türlerinin sığla yağı uygulanmış hücrelerinden daha fazla olduğu saptanmıştır. Yine K562S hücre hattında da sığla yağı uygulanmış grupta ilaç uygulanmış diğer gruba (imatinib uygulanmış) göre daha az ROS oluşumu gözlenmiştir. K562R ve K562S hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri Şekil 3.8. ve Şekil 3.9.'te gösterilmiştir.



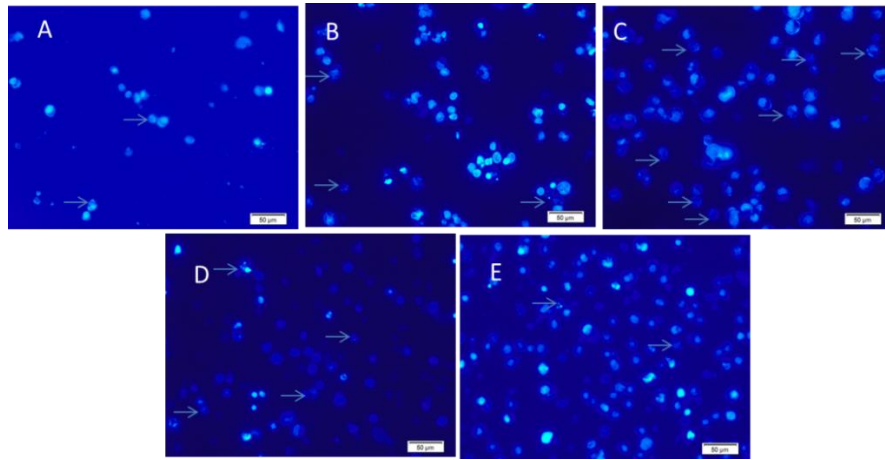
**Şekil 4.8.** K562R hücrelerinde oluşan ROS'un floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x)  
A)Pozitif kontrol B)Kontrol C)Sweetgum oil D)Ponatinib E)0,0015 µM Ponatinib + 150 µg/ml sweetgum oil F)0,0037 µM Ponatinib + 150 µg/ml sweetgum oil



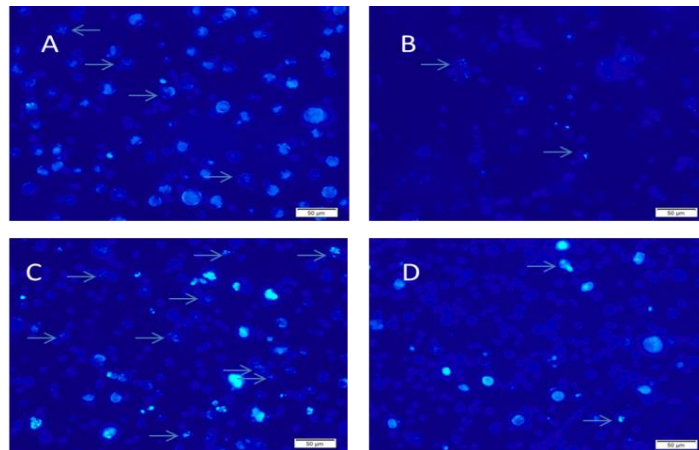
**Şekil 4.9.** K562S hücrelerinde oluşan ROS'un floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x)  
A)Pozitif kontrol B)Kontrol C)Sweetgum oil D)İmatinib E)2 µM imatinib + 100 µg/ml Sweetgum Oil

## 3. DNA hasarı gözlenmiştir.

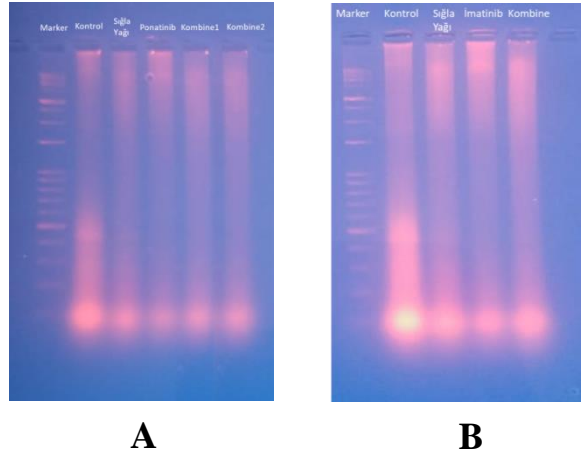
K562R ve K562S hücrelerine belirlenen dozlarda imatinib, ponatinib ve sığla yağı uygulamasının ardından 24 saat sonra Hoecsht (33342) boyası uygulanmış ve floresan mikroskop ile ve agaroz jel elektroforezi ile DNA kırıkları görüntülenmiştir. K562R ve K562S hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri Şekil 3.10. ve Şekil 3.11.'de gösterilmiştir. Şekillerde gri oklar oluşan DNA kırıklarını göstermektedir. İmatinib ve ponatinib uygulamalarında DNA hasarının kontrol ve sığla yağı gruplarına kıyasla arttığı görülmektedir. Agaroz jel elektroforezi görüntüleri ise Şekil 3.12.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.10.** K562R hücrelerinde DNA kırıklarının floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x) A)Kontrol B)Sweetgum oil C)Ponatinib D)0,0015 µM Ponatinib + 150 µg/ml Sweetgum oil E)0,0037 µM Ponatinib + 150 µg/ml Sweetgum oil



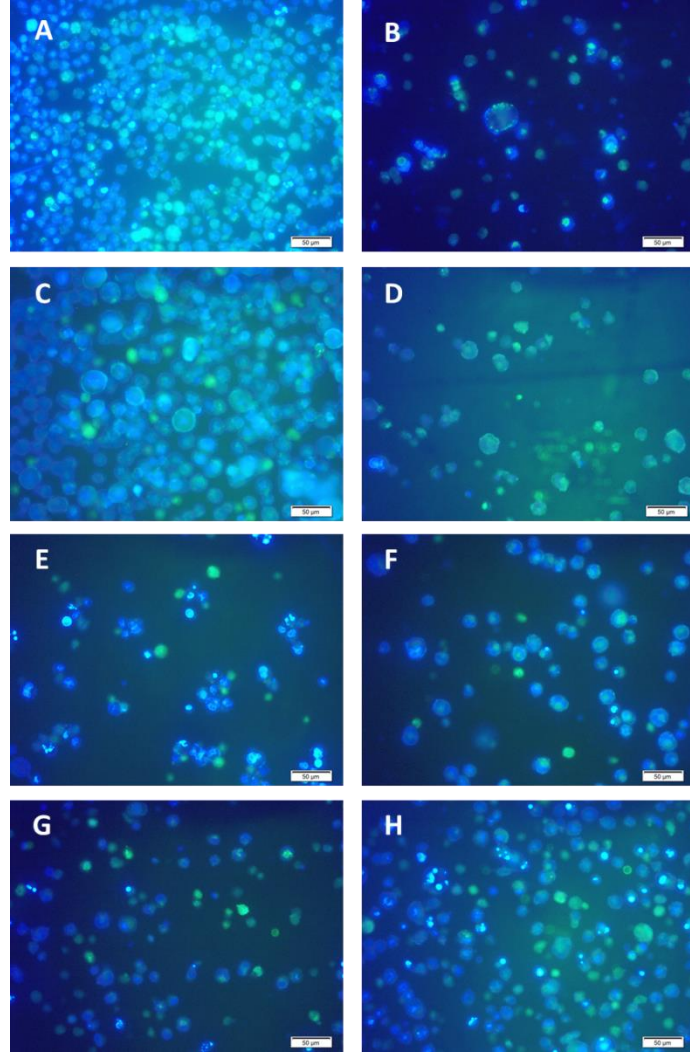
**Şekil 4.11.** K562S hücrelerinde DNA kırıklarının floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x) A)Kontrol B)Sweetgum oil C)İmatinib D)2 uM imatinib + 100 ug/ml Sweetgum Oil



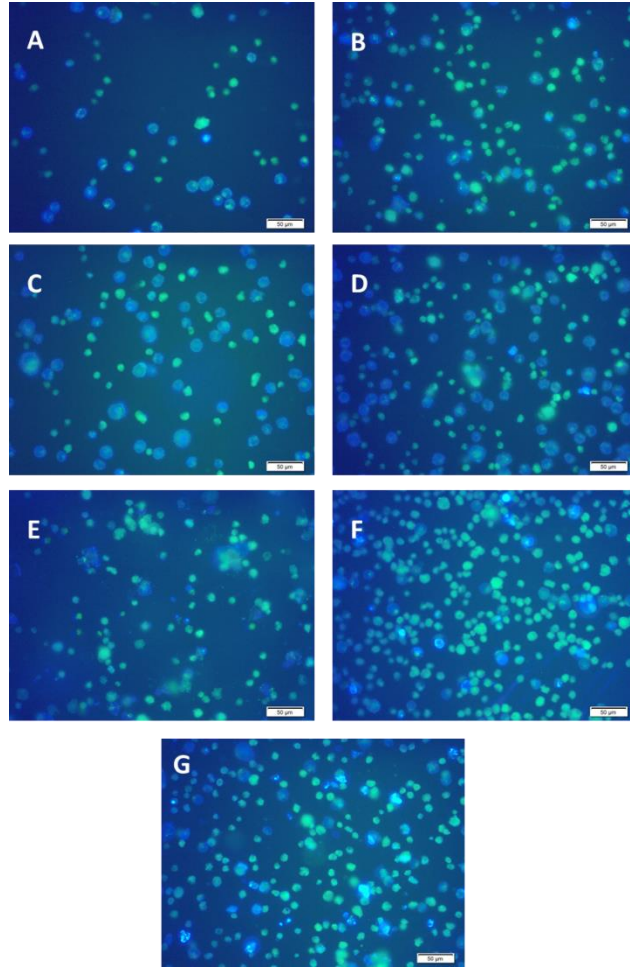
**Şekil 4.12.** K562R ve K562S hücrelerinde agaroz jel elektroforezi ile DNA kırıklarının gösterilmesi A) K562R hücreleri B) K562S hücreleri

4. Floresan mikroskopta hücrelerde meydana gelen otofaji gösterilmiştir.

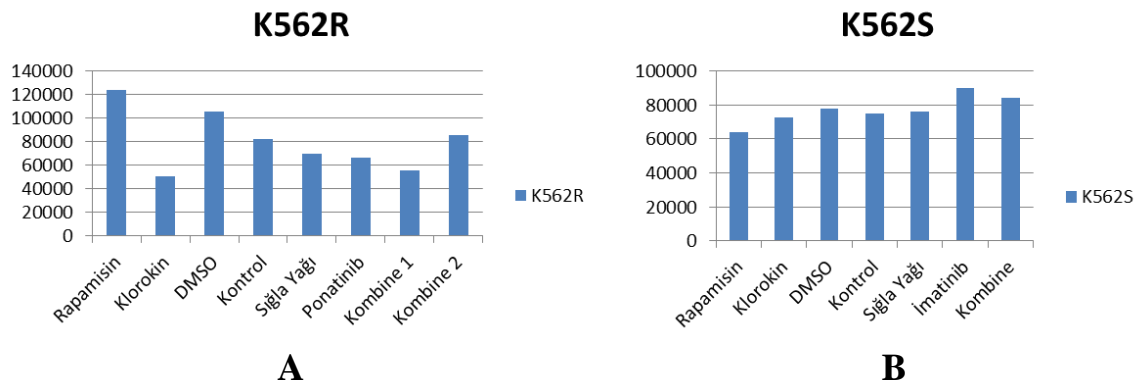
K562R ve K562S hücrelerinde otofajiyi saptamak amacıyla CYTO-ID otofaji saptama kiti kullanılmıştır. Hücreler belirlenen dozlarda ilaçlarla 24 saat inkübe edildikten sonra kit prosedürü uygulanmış ve floresan mikroskopta görüntüleri alınmıştır. K562R ve K562S hücrelerinde otofajik aktivasyonu gösteren floresan mikroskop görüntüleri Şekil 3.13. ve Şekil 3.14'ta gösterilmiştir. Şekil 3.15.'te ise otofajik aktivasyonun grafiği gösterilmiştir. K562R hücrelerinde sıgla yağının ponatinibe göre otofajik aktivasyonu artırdığı, K562S hücrelerinde ise imatinibe göre otofajik aktivasyonu azalttığı görülmektedir.



**Şekil 4.13.** 40X büyütme ile K562R hücrelerinde oluşan otofaji. A) Rapamisin B) Klorokin C) DMSO D) Kontrol E) Sığla Yağı F) Ponatinib G) 0,0015 µM Ponatinib + 150 µg/ml Sığla Yağı H) 0,0037 µM Ponatinib + 150 µg/ml Sığla Yağı



**Şekil 4.14.:** 40X büyütme ile K562S hücrelerinde oluşan otofaji. A) Rapamisin B) Klorokin C) DMSO D) Kontrol E) Sığla Yağı F)İmatinib G) 2 µM İmatinib + 100 µg/ml Sığla Yağı



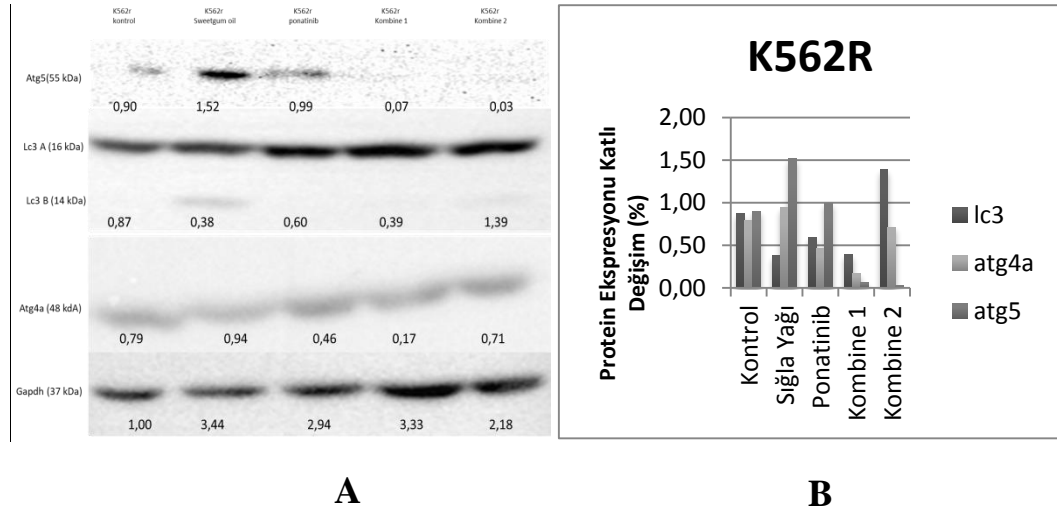
**Şekil 4.15.** Otofaji Grafiği A) K562R hücreleri B) K562S hücreleri

5. İmmunoblotlama yöntemi ile Atg4A, Atg5 ve LC3  $\alpha/\beta$  proteinlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

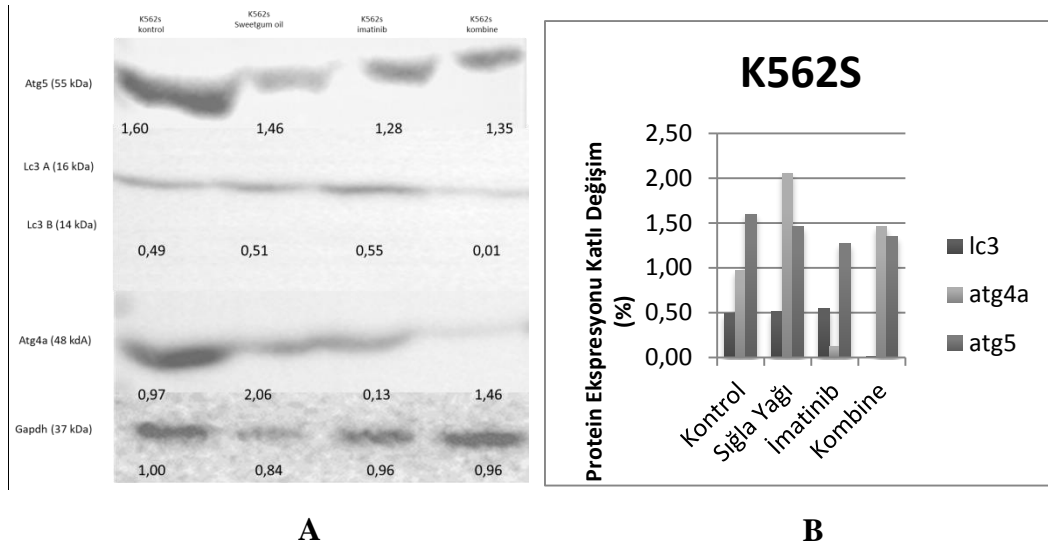
Sweetgum oil, imatinib ve ponatinib ile indüklenen K562S ve K562R hücrelerinde, Atg4A, Atg5 ve LC3  $\alpha/\beta$  proteinlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi gösterilmek amacıyla western blot yöntemi uygulanmıştır. K562R ve K562S hücrelerinin western blot görüntüleri ve kat değişim grafikleri Şekil 4.16. ve Şekil 4.17.'de gösterilmiştir.

K562R hücrelerinde LC3-I ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla sıgla yağı uygulanan grupta azaldığı western blot deneyinde görülmektedir. Sitozolik LC3-I'ye fosfatidietanolamin (PE) ilave edilerek LC3-II'ye dönüştürüldüğü bu durum otofajinin indüklendiği anlamına gelmektedir. Sıgla yağında Atg5 ekspresyonunun artması ise otofajinin aktive edildiği anlamı taşımaktadır. ROS azaldığı için Atg4A ekspresyonunun da sıgla yağı uygulanan grupta arttığı görülmektedir.

K562S hücrelerinde ise LC3-I ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla sıgla yağı ve imatinib uygulamasıyla birlikte arttığı kombine uygulamasında ise azaldığı gözlenmiştir. K562R hücrelerinde olduğu gibi K562S hücrelerinde sıgla yağının Atg5 ekspresyonunu arttırdığı görülmektedir. Kombine uygulamasında Otofaji indüksiyonunun sağlandığı görülmektedir. K562S hücrelerinde de ROS azaldığı için Atg4A ekspresyonunun da sıgla yağı uygulanan grupta arttığı görülmektedir.



**Şekil 4.16.** A) K562R hücrelerinde Atg5, Atg4A, LC3 $\alpha/\beta$  ve GAPDH proteinlerine ait western blot görüntüleri B) K562R hücrelerinde Atg5, Atg4A, LC3 $\alpha/\beta$  ve GAPDH proteinlerine ait katlı değişim grafiği



**Şekil 4.17.** A) K562S hücrelerinde Atg5, Atg4A, LC3 $\alpha/\beta$  ve GAPDH proteinlerine ait western blot görüntüleri B) K562S hücrelerinde Atg5, Atg4A, LC3 $\alpha/\beta$  ve GAPDH proteinlerine ait katlı değişim grafiği

## 5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kronik myeloid lösemi hastalarının tedavisinde kullanılan imatinibe direnç geliştirmiş olan K562R hücre hattında ve direnç göstermeyen K562S hücre hattında, kemoterapötik ajanların kullanımı sonucunda oluşan reaktif oksijen türlerinin DNA üzerinde oluşturdukları etkiler ve literatürde hücresel homeostazi sürdürmek için ROS ve otofajinin koordine olarak çalıştığı bilgisinden yola çıkılarak oluşan ROS'un otofaji aktivasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

*Liquidambar orientalis Mill (Hamamelidaceae)*'den elde edilen Sweetgum Oil (SO) Türk halk hekimliğinde antiülserojenik olarak yüzyıllar boyunca kullanılmıştır (Gurbuz, vd., 2013). SO'nin antioksidan aktivitesi Topal ve arkadaşları tarafından DPPH testi ile belirlenmiştir (Topal, vd., 2008). Süzek ve arkadaşları SO'nin antioksidan aktivitesini in vivo olarak kapsamlı bir şekilde araştırmışlardır (Suzek, vd., 2016:2).

Çalışmaya başlayabilmek için ilk olarak hücre hatları üzerinde ilaçların ve sığla yağının sitotoksitesini belirlemek amacıyla MTT testi yapılmıştır. MTT deneyi sonucunda elde edilen verilere göre sığla yağının artan dozlarıyla birlikte K562R ve K562S hücrelerinin canlılığında azalma gözlemlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada sığla yağındaki bazı maddelerin sitotoksik etki gösterdiği ve sığla yağının oksidatif stres kaynağı olabileceği gösterilmiştir. Sığla yağının bu özelliklerini DNA hasarı üzerinden gerçekleştirdiği ve bunun ise sığla yağının antimikrobiyal etkisinin kaynağı olduğu yapılan çalışmada vurgulanmıştır. Bu yüzden sığla yağının antioksidan etkisinin yanı sıra oksidan özelliği de olan bir bitki yağı olduğu belirtilmiştir (Karadeniz B., vd., 2013:5)

Sığla yağı kullanımında oluşan ROS'un K562R hücrelerinde ponatinibe kıyasla %28,8 oranında, K562S hücrelerinde ise imatinibe göre %23,8 oranında daha az olduğu görülmektedir. Kombine uygulamaları incelendiğinde ise ROS'un sığla yağının tekli uygulamalarına göre K562R hücrelerinde %67,56 oranında, K562S hücrelerinde ise %60,9 oranında azaldığını görmekteyiz. Bu durumda sığla yağının K562R ve K562S hücre hatları üzerinde tirozin kinaz inhibitörleri ile kombine uygulamasının ROS üzerine daha olumlu etkileri olduğu söylenebilir. Ayrıca TKİ direnci, TKİ'ye duyarlı

hücrelere göre daha yüksek ROS üretimi ile ilişkilendirilebilmektedir (Antoszewska-Smith, J., vd., 2017:1). Bu nedenle bu çalışmada TKİ direnci gösteren K562R hücreleri ile TKİ direnci göstermeyen duyarlı K562S hücrelerinde ROS üretimi karşılaştırılmıştır. Literatürdeki veriyle tutarlı olarak bu çalışmada K562R kontrol hücrelerinde, K562S kontrol hücrelerine göre %21,9 daha fazla ROS gözlenmiştir.

Bu çalışmada ROS'un neden olduğu DNA kırıklarını ve apoptozu göstermek amacıyla Hoecsht (33342) boyama ile DNA laddering deneyi yapılmıştır. K562R hücre hattında ponatinib uygulanmış hücrelerde daha fazla DNA kırıkları gözlenmiştir. K562S hücre hattında da imatinib uygulanmış grupta daha fazla DNA kırıkları gözlenmiştir. Bu sonuçlar ROS ile DNA hasarı arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

ROS, Atg4A'nın katalitik bölgesindeki sistein aminoasitlerini okside eder ve Atg4A'yı inaktif yapar. Sıgla yağının antioksidan özelliği ROS oluşumunun önüne geçilmesini sağlar. Sıgla yağı uygulanmış hücrelerde Atg4A ekspresyonunun daha fazla olduğu ve ROS'un fazla olduğu diğer gruplarda ise Atg4A ekspresyonunun azaldığı görülmektedir.

K562S hücrelerinde ise sıgla yağı uygulanmış gruplarda kontrol grubuna göre Atg4A ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar H2DCFDA ve Hoecsht (33342) boyama sonuçlarını destekler niteliktedir ve literatürdeki bilgilerle örtüşmektedir.

ROS ve otofaji, hücrel homeostazı korumak için etkileşime girer. ROS, otofajiyi indükleyebilir, ancak otofaji, hücrelerdeki ROS seviyesini kontrol etmek ve toksik etkilerini azaltmak için bir tampon sistemi olarak görev görür (Chen, Y. F., vd., 2017:2).

K562R hücrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla sıgla yağının ROS'u artırdığı gözlenmiştir. ROS'taki artışa rağmen floresan mikroskopta incelenen otofaji aktivasyonunda ise azalmaya neden olduğu görülmektedir. Aynı durum ponatinib için de geçerlidir. K562S hücrelerinde ise tam tersi olarak ROS'un arttığı durumda otofajinin de arttığı görülmektedir. Bu durum hücrelerde oluşan direncin ROS ve otofajinin çalışma sistemleri üzerine etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Hücrelerde otofaji indüklendiği zaman, sitozolik LC3-I'e fosfatidetanolamin (PE) ilave edilerek LC3-II'ye dönüştürülür ve LC3-II otofagozom membranlarına lokalize olur. Dolayısıyla, LC3-II ekspresyonu otofaji indüksiyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Hamurcu Z., vd., 2018:2). Otofajik aktiviteyi değerlendirmek amacıyla LC3 proteininin ve Atg5 proteininin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Artan ROS seviyelerinin K562R hücrelerinde otofajiyi baskılayıcı bir etki gösterdiği floresan mikroskopta gözlemlenmiştir. LC3-I ekspresyonunun sıgla yağı uygulanan grupta azaldığı da western blot deneyinde görülmektedir. K562S hücrelerinde ise LC3-I ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla sıgla yağı ve imatinib uygulamasıyla birlikte arttığı kombine uygulamasında ise azaldığı gözlenmiştir.

Otofajide vezikül membranının uzaması ve kesecik halini alması birinci übikuitin benzeri konjugasyon sisteminde Atg12 proteininin Atg5 proteinine kovalent olarak bağlanması ile katalize edilir. Atg12'ye bağlanmış Atg5, Atg16 ile de birleşerek izolasyon membranının dış yüzeyine bağlanır. Atg5 ekspresyonu zar uzamasını göstermektedir. K562R hücrelerinde ve K562S hücrelerinde sıgla yağı uygulanmış grupta Atg5 ekspresyonu imatinib ve ponatinibe göre artmıştır. Hücrelerde sıgla yağı kullanımı ile otofajik aktivasyonun arttığı anlaşılmaktadır.

Sıgla yağı ile yapılan çalışmalarda, sıgla yağının K562R ve K562S hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu ve hücreler üzerinde antitümör etki gösterdiği görülmüştür. Sıgla yağı hücre çoğalmasını doza bağlı olarak azaltmıştır. Sıgla yağının kanser kemoterapisini destekleyen hücre döngüsü, homeostaz, migrasyon, anjiyogenez gibi birçok biyolojik süreçte etkilerinin incelendiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Literatür çalışmaları doğrultusunda bu çalışmada elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda kemoterapötik ajanın kanser hücrelerini öldürmeye çalışırken oksidatif stres oluşturarak DNA hasarına neden olduğu görülmektedir. Aynı zamanda antioksidanların oksidan özellik de gösterebileceğinden dolayı kullanılan antioksidanın dozu konusunda hassas davranılmalıdır. Kanser kemoterapisinde antioksidanların kullanılması ile kanser hücrelerinin apoptozis ya da otofajik yolla ölmesi engellenmemelidir. Bu nedenle antioksidanların oksidatif stres üzerine etkilerinin ileriki çalışmalarda detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir.

Homeostazın devam ettirilmesi için ROS ve otofajiyi içeren sinyal iletim yollarının, moleküler mekanizmaların aydınlatılması, kanser kemoterapisi için yeni hedefler sağlayabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Antoszewska-Smith, vd. (2017).** Reactive oxygen species in BCR-ABL-expressing cells - Relevance to chronic myeloid leukemia. *Acta Biochimica Polonica*, 64(1), 1–10. [https://doi.org/10.18388/abp.2016\\_1396](https://doi.org/10.18388/abp.2016_1396)
- Arslan, D., vd. (2011).** Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması, (4), 184–194.
- Arslan, D., vd. (2011).** Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması, (4), 184–194.
- Aydınğöz ve Bulut (2014).** Hidden Healing Potion Of The Aegean: Sığla. *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering*, 14(1), 1–6. <https://doi.org/10.5578/fmbd.7084>
- Balcı Güçlü, A. G., (2020).** Quality of life in chronic myeloid leukemia patients in the era of generic imatinib. *Acta Oncologica Turcica* , 245-249.
- Beth Levine, & Guido Kroemer. (2008).** Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell.*, 132(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>.Autophagy
- Bhamidipati, P. K., vd. (2013).** Management of imatinib-resistant patients with chronic myeloid leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*, 4(2), 103–117. <https://doi.org/10.1177/2040620712468289>
- Chen, Y. F., vd. (2017).** The roles of reactive oxygen species (ROS) and autophagy in the survival and death of leukemia cells. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 112, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.02.004>
- Chen, Y., & Klionsky, D. J. (2011).** The regulation of autophagy - Unanswered questions. *Journal of Cell Science*, 124(2), 161–170. <https://doi.org/10.1242/jcs.064576>
- Clarkson B, vd. (2003).** Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia* 17: 1211–1262.
- Corbin, A. S., vd. (2003).** Several BCR-ABL kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood*, 101(11), 4611–4614. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3659>
- Cortes, J. E., vd. (1996).** Chronic myelogenous leukemia: A review. *American Journal of Medicine*, 100(5), 555–570. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(96\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(96)00061-7)
- Deininger, M. vd. (2000).** The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96(10), 3343–3356. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.10.3343>
- Deotare, U., vd. (2016).** Management of Elderly Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in the Accelerated or Blastic Phase. *Drugs and Aging*, 33(5), 335–345. <https://doi.org/10.1007/s40266-016-0351-8>
- Dong, Y., vd. (2019).** Targeted blocking of miR328 lysosomal degradation with alkalized exosomes sensitizes the chronic leukemia cells to imatinib. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(23–24), 9569–9582. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10127-3>
- Drexler, H. G. (1994).** Leukemia cell, 18(12), 38124.

- Duru, M. E., vd. (2002).** Composition of the volatile oils isolated from the leaves of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis* and *L. orientalis* var. *integriloba* from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(2), 95–98. <https://doi.org/10.1002/ffj.1050>
- Eisenberg-Lerner, A., & Kimchi, A. (2009).** The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis*, 14(4), 376–391. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0307-5>
- England, T. N. (2002).** IN CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA, 346(9), 645–652.
- Fang, Y., vd. (2016).** Autophagy maintains ubiquitination-proteasomal degradation of Sirt3 to limit oxidative stress in K562 leukemia cells. *Oncotarget*, 7(24), 35692–35702. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9592>
- Frazer, R., vd. (2007).** Chronic myeloid leukaemia in the 21st century. *Ulster Medical Journal*, 76(1), 8–17.
- Geng, J., & Klionsky, D. J. (2008).** The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” Review Series. *EMBO Reports*, 9(9), 859–864. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.163>
- Gurbuz I, vd. (2013).** Characterization of volatiles and anti-ulcerogenic effect of Turkish sweetgum balsam (*Styrax liquidus*). *J Ethnopharmacol* 148:332–6.
- Halliwell B. (1996).** Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Res* 25:57–74.
- Hamad, A., vd. (2013).** Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells. *Stem Cells International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/724360>
- Hamurcu Z., vd. (2018).** Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of CyclinD1 and uPAR/Integrin  $\beta$ 1/ Src signaling in triple negative breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018;144(3):415-430.
- Hao, G., vd. (2020).** Acetylshikonin induces apoptosis of human leukemia cell line K562 by inducing S phase cell cycle arrest, modulating ROS accumulation, depleting BCR-ABL and blocking NF- $\kappa$ B signaling. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 122(June 2019), 109677. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109677>
- Hochhaus, A., vd. (2019).** Therapy of chronic myelogenous leukemia. *Onkologe*, 25(11), 971–984. <https://doi.org/10.1007/s00761-019-0638-6>
- Kantarjian, H. M. (2019).** Kantarjian H\_Blood\_pg3540-3546\_2007.pdf, 110(10), 3540–3547. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-080689>.The
- Karadeniz, B., vd. (2013).** Genotoxic and cytotoxic effects of storax in vitro. *Toxicology and Industrial Health*, 29(2), 181–186. <https://doi.org/10.1177/0748233711428642>
- Koptyra, M., vd. (2006).** BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood*, 108(1), 319–327. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2815>

**Meléndez, A., & Levine, B. (2009).** Autophagy in *C. elegans*. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–26. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.147.1>

**Mi, T., vd. (2018).** The cooperative relationship between STAT5 and reactive oxygen species in leukemia: Mechanism and therapeutic potential. *Cancers*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/cancers10100359>

**Michels, U. (2003).** Atlas de música, 1, 24(5), 282. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008.Reactive>

**Mirza, M. A. B., vd. (2019).** microRNA-21 expression as prognostic and therapeutic response marker in chronic myeloid leukaemia patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(8), 2379–2383. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.8.2379>

**Molecular biology of BCR-ABL–positive chronic myeloid leukemia.pdf. (n.d.).**

**Mughal, T. & Goldman, J. (2006).** Division of Hematology and Oncology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts and the Hematology Branch, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. *Most*, (3), 209–220.

**Murat, A., & Kaya, Z. (2003).** Oriental sweet gum (*Liquidambar orientalis*). *EUFORGEN Technical Guidelines for Genetic Conservation and Use*, 1–6.

**Nikoletopoulou, V., vd. (2015).** Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 398–407. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.204>

**O’Hare, T., vd. (2009).** AP24534, a Pan-BCR-ABL Inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia, Potently Inhibits the T315I Mutant and Overcomes Mutation-Based Resistance. *Cancer Cell*, 16(5), 401–412. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.028>

**Okmen, G., vd. (2014).** The antimicrobial activity of *Liquidambar orientalis* mill. Against food pathogens and antioxidant capacity of leaf extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(5), 28–33. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v11i5.4>

**Owusu-Ansah, E., & Banerjee, U. (2009).** Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, 461(7263), 537–541. <https://doi.org/10.1038/nature08313>

**Patel, A. B., vd. (2017).** Treating the chronic-phase chronic myeloid leukemia patient: which TKI, when to switch and when to stop? *Expert Review of Hematology*, 10(7), 659–674. <https://doi.org/10.1080/17474086.2017.1330144>

**Sagdic O, vd. (2005).** Study on inhibitory effects of *Sigla* tree (*Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*) storax against several bacteria. *Phytother Res* 19:549–51.

**Salesse, S., & Verfaillie, C. M. (2002).** BCR/ABL: From molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*, 21(56 REV. ISS. 7), 8547–8559. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206082>

- Sawyers, C. L., vd. (2002).** Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: Results of a phase II study. *Blood*, 99(10), 3530–3539. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3530>
- Staal, F. J. T., vd. (2016).** Aberrant Wnt signaling in leukemia. *Cancers*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/cancers8090078>
- Suzek, H., vd. (2016).** Protective effect and antioxidant role of sweetgum (*Liquidambar orientalis*) oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Pharmaceutical Biology*, 54(3), 451–457. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1045086>
- Topal, U., vd. (2008).** Chemical compositions and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plants obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(7–8), 619–634. <https://doi.org/10.1080/09637480701553816>
- Udensi, U. K., & Tchounwou, P. B. (2014).** Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 33(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13046-014-0106-5>
- Van Erp, A. C., vd. (2017).** The crosstalk between ROS and autophagy in the field of transplantation medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7120962>
- von Bubnoff, N., vd. (2003).** Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): A targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia*, 17(5), 829–838. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402889>
- Yang, Y. P., vd. (2005).** Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(12), 1421–1434. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00235.x>
- Young, M. A., vd. (2006).** Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant ABL mutant in complex with the aurora kinase inhibitor VX-680. *Cancer Research*, 66(2), 1007–1014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2788>

## 7. EKLER

Bu çalışma, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi 2019-01.BŞEÜ.04-01 numaralı Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

Proje kapsamında laboratuvar sarf malzemelerinin ve kimyasal malzemelerin temini için bütçe talep edilmiştir. Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi tarafından sunulan 12,494,97 TL destek laboratuvar sarf malzemelerinin ve kimyasal malzemelerin alımı için harcanmıştır.

Bu proje ile Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Melike Bügöl Kılınçarşlan'ın yüksek lisans tezi gerçekleştirilmiştir. Proje kapsamındaki çalışmalarda elde edilen verilerden makale ve tebliğ yayımlanması planlanmaktadır.