

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELİKE BÜĞÜL KILINÇARSLAN

TEZ DANIŐMANI
DOÇ. DR. ONUR EROĞLU

BİLECİK, 2021

10381422

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İMATİNİB DİRENÇLİ K562R HÜCRE HATTINDA KEMOTERAPÖTİK
AJANLARIN OLUŞTURDUĞU REAKTİF OKSİJEN TÜRLEİNİN SİĞLA YAĞI
İLE ORTADAN KALDIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELİKE BÜĞÜL KILINÇARSLAN

TEZ DANIŐMANI
DOÇ. DR. ONUR EROĞLU

BİLECİK, 2021

10381422

BEYAN

“İmatinib Dirençli K562R Hücre Hattında Kemoterapötik Ajanların Oluşturduğu Reaktif Oksijen Türlerinin Sığla Yağı İle Ortadan Kaldırılması” adlı yüksek lisans tezinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel ahlak kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

DESTEK ALINMIŞTIR	X	DESTEK ALINMAMIŞTIR
Destek alındı ise;		
Destekleyen Kurum:		
Desteğin Türü		Proje Numarası
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)	X	2019-01.BŞEÜ.04-01
2- TÜBİTAK		
Diğer;		

Melike BÜGÜL KILINÇARSLAN

ÖN SÖZ

Bilgi ve deneyimlerini tez çalışmam süresince esirgemeyerek tezimin aşamalarında beni yönlendiren ve tezimi yürütebilmem için gerekli laboratuvar ortamı ve imkânları sağlayan danışman hocam sayın Doç. Dr. Onur EROĞLU'na teşekkür ederim.

Laboratuvarda karşılaştığım tüm zorluklarda bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Arş. Gör. Esin GÜVENİR ÇELİK ve Arş. Gör. Hacer KAYA'ya teşekkür ederim.

Tezimde kullandığım K562S hücre hatlarının temininde bana yardımcı olan Tübitak MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nden Dr. Yüksel ÇETİN ve değerli arkadaşım Ayşen GÜNGÖR'e, K562R hücre hattının temininden dolayı Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Zeynep YÜCE ve ekibine teşekkür ederim.

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

Eğitim-öğretim hayatım boyunca bana cesaret veren, ben ve kardeşim için her zaman en iyisini arzulayan ve maddi-manevi hiçbir yardım ve desteğini esirgemeyen canım babam Recep BÜGÜL'e, hayatımın tüm dönemlerinde olduğu gibi tez dönemim boyunca da tüm mutlu ve sıkıntılı anlarımı paylaştığım biricik annem Süreyya BÜGÜL'e, hayatımda iyi ki var dediğim kardeşim Melih BÜGÜL'e ve yoğun çalışmalarım sırasında üstün bir sabır gösteren, desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim hayat arkadaşım sevgili eşim Halil KILINÇARSLAN'a yürekten teşekkür ederim.

Melike BÜGÜL KILINÇARSLAN



Sevgisini ve desteğini her zaman hissettiren babama..

ÖZET

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

Sweetgum Oil (SO), *Liquidambar orientalis*'in yaralı gövdesinden elde edilen "Sıgla Yağı" adıyla yerel olarak isimlendirilen reçineli bir eksüdatıdır. SO'nun antibakteriyel, antioksidan, antiseptik ve antienflamatuar özellikleri birçok çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmada dirençli K562R ve duyarlı K562S kronik myeloid lösemi hücre hatlarında ROS oluşumu üzerine farklılıkların belirlenmesi ve ROS'un otofaji üzerindeki etkilerinin gözlenmesi amacıyla sitotoksik dozda Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKİ) ile sıgla yağı kombinasyonu hücre hatlarına uygulanmıştır. K562R ve K562S hücre hatlarında sitotoksisite, ROS oluşumu, DNA hasarı, otofaji ve otofaji ile ilişkili proteinlerden otofagozom oluşumunda rol oynayan LC3 α/β proteini ile ROS oluşumuna bağlı olarak inaktif hale gelen Atg4A proteininin ekspresyon seviyelerine etkileri incelenmiştir. Sitotoksisite çalışmalarında sıgla yağının K562R hücrelerinde IC₅₀ değeri 250 $\mu\text{g/ml}$, K562S hücrelerinde IC₅₀ değeri 150 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. H₂DCFDA boyama ile 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. Kombine uygulamalarında ise sıgla yağının tekli uygulamalarına göre ROS'un K562R hücrelerinde %67,56 oranında, K562S hücrelerinde ise %60,9 oranında azaldığı görülmüştür. K562R hücrelerinde, K562S hücrelerine göre %21,9 daha fazla ROS gözlenmiştir. Oluşan ROS'a bağlı olarak tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi edilen hücrelerde sıgla yağı ile tedavi edilen hücrelere göre daha fazla DNA hasarı meydana gelmiştir. K562R hücrelerinde sıgla yağının otofaji aktivasyonunda azalmaya neden olduğu K562S hücrelerinde ise otofaji aktivasyonunda artış sağladığı floresan mikroskop ile gözlenmiştir. Western blot deneyinde sıgla yağı uygulanmış hücrelerde Atg4A ekspresyonunun daha fazla olduğu ve ROS'un fazla olduğu diğer gruplarda ise Atg4A ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. LC3-I ekspresyonu ise sıgla yağı uygulandığında K562R hücrelerinde azalmış, K562S hücrelerinde ise artış göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: K562R, Sıgla Yağı, ROS, Otofaji

ABSTRACT

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

Sweetgum Oil (SO) is a resinous exudate locally named " Sığla Yağı " obtained from the injured body of *Liquidambar orientalis*. Antibacterial, antioxidant, antiseptic and anti-inflammatory properties of SO have been reported in many studies. In this study, cytotoxic dose Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI) and Sweetgum Oil combination was applied to cell lines in order to determine the differences on ROS formation in resistant K562R and sensitive K562S chronic myeloid leukemia cell lines and to observe the effects of ROS on autophagy. In K562R and K562S cell lines, the effects of the LC3 α/β protein, which plays a role in the formation of autophagosomes, which are related to cytotoxicity, ROS formation, DNA damage, autophagy and autophagy, and the Atg4A protein, which becomes inactive due to ROS formation, on expression levels were examined. In cytotoxicity studies, the IC50 value of sweetgum oil in K562R cells was determined as 250 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and in K562S cells as 150 $\mu\text{g} / \text{ml}$. It was observed that the ROS formed by the use of sweetgum oil with H2DCFDA staining was 28.8% less in K562R cells compared to ponatinib and 23.8% less in K562S cells than imatinib. In combined applications, according to the single applications of sweetgum oil, it was observed that ROS decreased by 67.56% in K562R cells and 60.9% in K562S cells. 21.9% more ROS were observed in K562R cells than in K562S cells. Due to the ROS generated, more DNA damage occurred in cells treated with tyrosine kinase inhibitors than cells treated with sweetgum oil. It was observed by fluorescent microscope that sweetgum oil caused a decrease in autophagy activation in K562R cells and increased autophagy activation in K562S cells. In the Western blot experiment, it was observed that Atg4A expression was higher in cells treated with sweetgum oil, and Atg4A expression was decreased in other groups with high ROS. LC3-I expression decreased in K562R cells and increased in K562S cells when sweetgum oil was applied.

Keywords: K562R, Sweetgum Oil, ROS, Autophagy

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
GRAFİKLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Hematopoetik hücrelerin gelişimi.....	3
2.2. Lösemi	4
2.2.1. Kronik myeloid lösemi: tanımı ve tarihçesi	4
2.2.2. Kronik myeloid lösemi fazları	5
2.2.3. Kronik myeloid lösemi epidemiyolojisi	6
2.2.4. Kronik miyeloid lösemi patogenezi.....	6
2.2.4.1. Philadelphia kromozomu	6
2.2.4.2. ABL onkogeni	7
2.2.4.3. BCR geni ve proteini	8
2.2.4.4. BCR-ABL füzyon geni ve füzyon proteini.....	9
2.2.5. K562 Hücre Hattının Karyotipi	12
2.2.6. KML TEDAVİSİ.....	12
2.2.6.1. KML tedavisinde TKİ kullanılması.....	14
2.2.6.2. Birinci nesil TKİ: İmatinib	14

2.2.6.3. İkinci nesil TKİ'ler ve etki mekanizmaları	18
2.2.6.4. Üçüncü nesil TKİ: Ponatinib	19
2.3. <i>Liquidambar orientalis</i> (sweetgum oil, sığla yağı)	20
2.4. Reaktif oksijen türleri (ROS)	21
2.5. Otofaji.....	24
2.5.1. Otofaji Türleri	25
2.5.2. Otofajinin Mekanizması	25
2.5.3. Otofajinin Düzenlenmesinde ROS'un Rolü	28
3. MATERYAL VE METOTLAR.....	30
3.1. Materyaller	30
3.1.1. Kullanılan cihazlar	30
3.1.2. Sarf malzemeler	31
3.1.3. Kullanılan kimyasallar	32
3.1.4. Kullanılan çözeltiler	33
3.2. Yöntemler.....	37
3.2.1. Kullanılan hücre hatları.....	37
3.2.2. Kullanılan kemoterapötik ilaçların hazırlanması	38
3.2.3. Hücre kültürü	39
3.2.4. Hücre canlılığının değerlendirilmesi (tripan mavisi canlılık testi)	40
3.2.5. Sitotoksosite çalışmaları.....	41
3.2.6. ROS tespiti	43
3.2.7. DNA hasarının belirlenmesi	43
3.2.8. Otofaji belirlenmesi	44
3.2.9. İmmünblotlama yöntemi.....	45
3.2.10. İstatistiksel analiz	47
4. BULGULAR	48

4.1. Hücre hattı bulguları	48
4.2. Hücre canlılığının değerlendirilmesi (tripan mavisi canlılık testi)	48
4.3. Sitotoksitenin belirlenmesi.....	49
4.3.1. K562R hücre hattında sıgla yağının sitotoksitesinin belirlenmesi	49
4.3.2. K562R hücre hattında ponatinibin sitotoksitesinin belirlenmesi	50
4.3.3. K562R hücre hattında sıgla yağı ve ponatinib kombinasyon analizleri.....	51
4.3.4. K562S hücre hattında sıgla yağının sitotoksitesinin belirlenmesi	53
4.3.5. K562S hücre hattında imatinibin sitotoksitesinin belirlenmesi.....	53
4.3.6. K562S hücre hattında sıgla yağı ve imatinib kombinasyon analizleri.....	54
4.4. ROS Tespiti.....	55
4.5. DNA hasarının belirlenmesi	56
4.6. Otofaji belirlenmesi.....	58
4.7. İmmunblotlama metodu	61
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	77

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Kemik iliğinde hematopoez	3
Şekil 2.2. Majör lösemi türleri	4
Şekil 2.3. Philadelphia kromozomu	7
Şekil 2.4. Abl proteininin yapısal alanları.....	8
Şekil 2.5. Bcr proteininin yapısı.....	9
Şekil 2.6. Keme noktalarının ABL ve BCR genlerindeki yerleri ve çeşitli kesmelerden türetilen kimerik BCR / ABL mRNA transkriptlerinin yapısı.....	10
Şekil 2.7. P210 BCR / ABL'nin fonksiyonel alanları	10
Şekil 2.8. P210 BCR / ABL'nin sinyal yolları.....	11
Şekil 2.9. KML Tedavisinin Zaman Tablosu.....	14
Şekil 2.10. ABL'de imatinib bağlanma bölgesinin merkezinde Thr315 gatekeeper gösterilmesi.	15
Şekil 2.11. İmatinib'in etki mekanizması.	16
Şekil 2.12. Direnç mekanizmaları.....	17
Şekil 2.13. <i>Liquidambar orientalis</i> 'in Türkiye'deki yayılış alanları	20
Şekil 2.14. ROS tarafından düzenlenen hücrel sinyal yolları.....	22
Şekil 2.15. Oksidatif stresin şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.16. Dengesizliğin oksidatif strese yol açabileceği oksidan ve antioksidan türleri.....	24
Şekil 2.17. Üç tip otofajinin şematik gösterimi	25
Şekil 2.18. Otofaji basamakları.....	26
Şekil 2.19. Reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından otofajinin düzenlenmesi	28
Şekil 3.1. Kullanılan protein marker (CST).....	46
Şekil 4.1. Hücrelerin görüntüleri A) K562S hücrelerin görüntüsü. B) K562R hücrelerin görüntüsü.....	48

Şekil 4.2. İmatinibin farklı dozları ile 48 saat inkübasyona bırakılan hücrelerin mikroskop görüntüsü.....	49
Şekil 4.3. K562R hücrelerinde oluşan ROS'un floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x) A)Pozitif kontrol B)Kontrol C) Sığla Yağı D)Ponatinib E)0,0015 µM Ponatinib + 150 µg/ml Sığla Yağı F)0,0037 µM Ponatinib + 150 µg/ml Sığla Yağı	55
Şekil 4.4. K562S hücrelerinde oluşan ROS'un floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x) A)Pozitif kontrol B)Kontrol C) Sığla Yağı D)İmatinib E)2 µM imatinib + 100 µg/ml Sığla Yağı.....	56
Şekil 4.5. K562R hücrelerinde DNA kırıklarının floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x) A)Kontrol B) Sığla Yağı C)Ponatinib D)0,0015 µM Ponatinib + 150 µg/ml Sığla Yağı E)0,0037 µM Ponatinib + 150 µg/ml sweetgum oil (Oklar DNA kırıklarını göstermektedir.)	57
Şekil 4.6. K562S hücrelerinde DNA kırıklarının floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x) A)Kontrol B) Sığla Yağı C)İmatinib D)2 µM imatinib + 100 µg/ml Sığla Yağı (Oklar DNA kırıklarını göstermektedir.).....	57
Şekil 4.7. Agaroz jel elektroforezi ile DNA kırıklarının gösterilmesi.....	58
Şekil 4.8. 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	59
Şekil 4.9. 40x büyütme ile K562S hücrelerinde oluşan otofaji. A) Rapamisin B) Klorokin C) DMSO D) Kontrol E) Sığla Yağı F) İmatinib G) 2 µM imatinib + 100 µg/ml Sığla Yağı.....	60
Şekil 4.10. A) K562R hücrelerinde Atg4A, LC3 α/β ve GAPDH proteinlerine ait western blot görüntüleri B) K562R hücrelerinde Atg4A ve LC3 α/β proteinlerine ait katlı değişim grafiği.....	62
Şekil 4.11. A) K562S hücrelerinde Atg4A, LC3 α/β ve GAPDH proteinlerine ait western blot görüntüleri B) K562S hücrelerinde Atg4A ve LC3 α/β proteinlerine ait katlı değişim grafiği.....	62

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Tirozin kinaz inhibitörlerinin özeti ve bunların T315I üzerindeki etkileri.	19
Tablo 3.1. Laboratuvarda kullanılan cihazlar.	30
Tablo 3.2. laboratuvarda kullanılan malzemeler.	31
Tablo 3.3. Laboratuvarda kullanılan kimyasallar.	32
Tablo 3.4. 1X PBS tampon içeriği.	34
Tablo 3.5. Lyzis buffer içeriği.	35
Tablo 3.6. TE buffer içeriği.	35
Tablo 3.7. 50X TAE içeriği.	355
Tablo 3.8. SDS poliakrilamid jel içeriği.	36
Tablo 3.9. 10X Towbin transfer tamponu içeriği.	37
Tablo 3.10. K562R Hücre Hattı Özellikleri.	38
Tablo 3.11. K562S Hücre Hattı Özellikleri.	38
Tablo 4.1. Tripan Blue Canlılık Testi sonucunda hücre sayıları.	49

GRAFİKLER LİSTESİ

	Sayfa No
Grafik 4.1. K562R hücre hattında 1 μM imatinib eklenmiş büyüme ortamında sığla yağı MTT sonuçları (IC50 değeri 250 $\mu\text{g/ml}$).	50
Grafik 4.2. K562R hücre hattında imatinib eklenmemiş büyüme ortamında sığla yağı MTT sonuçları (IC50 değeri 250 $\mu\text{g/ml}$).	50
Grafik 4.3. K562R hücre hattında 1 μM imatinib eklenmiş büyüme ortamında ponatinib MTT sonuçları (IC50 değeri 0.015 μM).	51
Grafik 4.4. K562R hücre hattında imatinib eklenmemiş büyüme ortamında ponatinib MTT sonuçları (IC50 değeri 0.020 μM).	51
Grafik 4.5. K562R hücre hattında 1 μM imatinib eklenmiş büyüme ortamında ponatinib ve sığla yağı kombine MTT sonuçları (IC50 değeri 0,0015 μM Ponatinib + 150 $\mu\text{g/ml}$ sığla yağı).	522
Grafik 4.6. K562R hücre hattında İmatinib eklenmemiş büyüme ortamında ponatinib ve sığla yağı kombine MTT sonuçları (IC50 değeri 0,0037 μM Ponatinib + 150 $\mu\text{g/ml}$ sığla yağı).	522
Grafik 4.7. K562S hücre hattında sığla yağı MTT sonuçları (IC50 değeri 150 $\mu\text{g/ml}$).	533
Grafik 4.8. K562S hücre hattında imatinib MTT sonuçları (IC50 değeri 10 μM).	544
Grafik 4.9. K562S hücre hattında imatinib ve sığla yağı kombine MTT sonuçları (IC50 değeri 2 μM imatinib + 100 $\mu\text{g/ml}$ sığla yağı).	544
Grafik 4.10. Oluşan ROS'un Grafiği A) K562R hücrelerinde ROS. B) K562S hücrelerinde ROS.	56
Grafik 4.11. Otofaji Grafiği A) K562R hücreleri. B) K562S hücreleri.	58

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

\cdot-OH	: Hidroksil radikal
μ-BCR	: Mikro BCR
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μg/ml	: Mikrogram / mililitre
μM	: Mikromolar
β – Actin	: Beta aktin
ABL	: Abelson Mürin Lösemi Virüsü
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
alloSCT	: Allojenik Kök Hücre Transplantasyonu
AML	: Akut Myeloid Lösemi
AMN107	: Nilotinib Orijinal Adlandırması
AP24534	: Ponatinib Orijinal Adlandırması
AP-KML	: Akselere Faz Kronik Myeloid Lösemi
APS	: Amonyum Persülfat
Atg	: Otofaji İlişkili Protein
BCR	: Kırılma Noktası Küme Bölgesi (Breakpoint Cluster Region)
BMS-354825	: Dasatinib Orijinal Adlandırması
BP-KML	: Blastik Faz Kronik Myeloid Lösemi
BSA	: Sığır Serum Albumin
CHR	: Tam hematolojik yanıt
CMA	: Şaperon aracılı otofaji
CNS	: Merkezi Sinir Sistemi
CO₂	: Karbondioksit
CP-KML	: Kronik Faz Kronik Myeloid Lösemi

DFS	: Hastaliksız sağkalım
Dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil Radikali
ECL	: Güçlendirilmiş Kemilüminesans
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtBr	: Etidyum Bromür
FBS	: Fetal Sığır Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FE	: Fosfotidiletanolamin
FIP200	: FAK Ailesi Etkileşimli 200 kDa Protein
g (RCF)	: Bağlı Santrifüj Kuvveti
GAP	: GTPaz Aktive Edici Protein
H₂O₂	: Hidrojen eProksit
H₂DCFDA	: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein Diacetate
HBSS	: Hanks'in Dengeli Tuz çözeltisi
HCl	: Hidroklorik Asit
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
HSC	: Hematopoietic Kök Hücre
IC₅₀	: Yarı-maksimal inhibitör konsantrasyon
IM	: İmatinib
Kb	: kilobaz
KCl	: Potasyum Klorür
kD	: KiloDalton
KH₂PO₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat

KLL	: Kronik Lenfoblastik Lösemi
KML	: Kronik Myeloid Lösemi
LC3 α/β	: Mikrotübül ile ilişkili protein 1A / 1B-hafif zincir 3
m-BCR	: Minör BCR
M-BCR	: Majör BCR
ml	: mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
Na₂HPO₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
ng/μL	: Nanogram/mikrolitre
nm	: Nanometre
O₂⁻	: Süperoksit anyon
OS	: Oksidatif stres
PAS	: Preotofagozomal Yapı
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PDGFR	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
Ph	: Philadelphia Kromozomu
PI-3 kinaz	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PMSF	: Fenilmetilsülfonil Florid
PVDF	: Poliviniliden Florid
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Institute

SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SH	: Src Kinaz Homoloji Alanı
SKI-606	: Bosutinib Orijinal Adlandırması
SO	: Sweetgum Oil (Sığla Yağı)
STI571	: Imatinib Orijinal Adlandırması
T315I	: Treonin 315 İzolösün Mutasyonu
TAE	: Tris-Asetikasit-EDTA
TBS	: Tris- Tamponlu Tuz Çözeltisi
TBS-T	: Tween 20 İçeren Tris- Tamponlu Tuz Çözeltisi
TE	: Tris- EDTA
TKİ	: Tirozin Kinaz İnhibitörü
TOR	: Rapamisin Hedefi Protein
ULK	: UNC-51 Benzeri Kinaz
V	: Volt
WBC	: Beyaz Kan Hücresi

1. GİRİŞ

Kronik myeloid lösemi (KML), kromozom 9 ve kromozom 22 arasında bir karşılıklı translokasyon ile üretilen yapısal olarak aktif bir tirozin kinaz olan BCR/ABL onkoproteininin varlığı ile karakterize edilen hematopoietik kök hücrelerin malign hematolojik bir hastalığıdır (Deininger, vd., 2000:1)

İmatinib (STI571 veya Gleevec), KML hastalarının tedavisinde oldukça etkilidir ve KML için birinci basamak tedavi olarak kullanılır (Clarkson, vd., 2003:32; Mauro ve Deininger, 2006:1). Bununla birlikte, kronik faz KML uzamış tedaviden 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, blast krizinde bir insan KML hastasından oluşturulan hematopoietik bir progenitör hücre dizisidir (Clarkson, vd., 2003:6; Drexler, 1994:1). K562R hücreleri sınırsız çoğalma kabiliyetine sahiptir ancak farklılaşmaya devam edemezler (H. M. Huang, vd., 2004:1). K562R hücrelerinin bu çalışmada kullanılmasının sebebi imatinib direnci göstermesi ve oksidatif stres, sitotoksikite ve anti-kanser çalışmalarda önceden kullanılmış olmasıdır.

Ponatinib önceki TKİ tedavisine dirençli veya toleranssız Ph⁺ (Philadelphia Kromozomu) ALL (Akut Lenfoblastik Lösemi) ve KML hastalarının tedavisi için onaylanmıştır (W. S. Huang, vd., 2010:2). Tedaviye dirençli KML hastalarında BCR-ABL T315I mutasyonunun aktivitesini inhibe edebildiği O'Hare ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (O'Hare, T., vd., 2009:5)

BCR/ABL füzyonu imatinib mesilat direncinde önemli bir rol oynar. BCR/ABL kinazın, oksidatif DNA hasarına neden olan 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). Reaktif oksijen türlerinin oksidatif stresi indükleyerek ya karsinogenezin başlangıcında ya da ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Gülçin, 2006:6). Halliwell ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada DNA, lipid ve proteinlere oksidatif hasarın kardiyovasküler hastalık, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların gelişimine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Halliwell, 1996:1).

Liquidambar orientalis Mill (Hamamelidaceae)'dan elde edilen Sweetgum Oil (SO) Türk halk hekimliğinde yüzyıllardır antiülserojenik olarak kullanılmıştır (Gurbuz, vd., 2013:3). SO'nun antibakteriyel aktivitesi Sağdıç ve arkadaşlarının yaptığı in vitro tekniklerle

bildirilmiştir (Sagdic, vd., 2005:2). Antioksidan aktivitesi ise Topal ve arkadaşları tarafından DPPH testi ile belirlenmiştir (Topal, vd., 2008:15). Süzek ve arkadaşları SO'nin antioksidan aktivitesini in vivo olarak kapsamlı bir şekilde araştırmışlardır. Karaciğer dokularının araştırılmasıyla elde edilen verilere göre SO'in koruyucu bir özellikte olduğu ve antioksidan aktivitesi olduğu sonucuna varmışlardır (Suzek, vd.,2016:5). *Liquidambar orientalis*, Türkiye'nin güneybatı sahil bölgesinde, özellikle Köyceğiz, Fethiye, Marmaris ve Ula'da yayılmaktadır. SO, *Liquidambar orientalis*'in yaralı gövdesinden elde edilen “Sığla Yağı” adıyla yerel olarak isimlendirilen reçineli bir eksüdatıdır (Suzek, vd.,2016:2).

Otofaji, sitoplazmik materyalin, ya homeostaziyi korumak için ya da açlıkta enerji ve besinler için geri dönüştürülmesi için bozulduğu hücrel bir süreçtir (Kumar, vd., 2012:1).

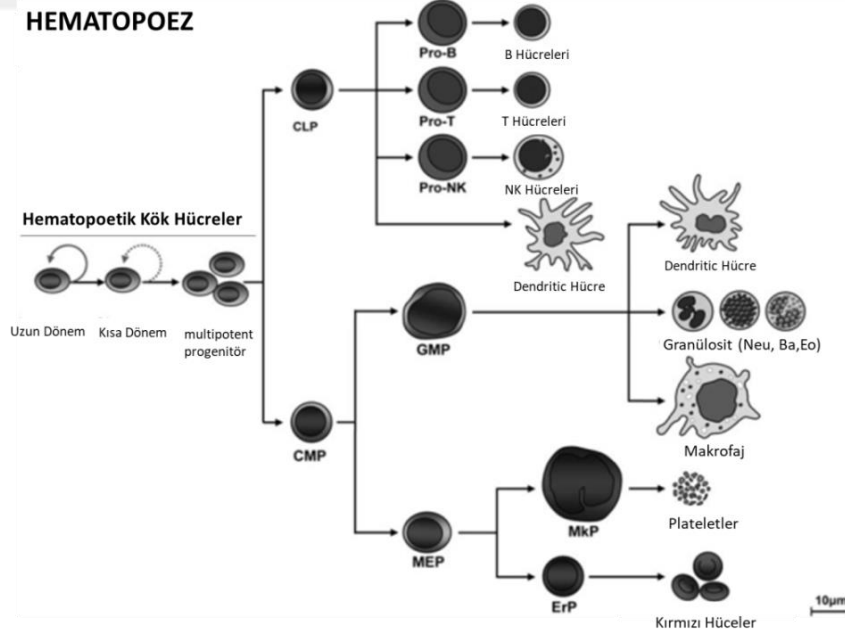
Bu çalışmanın amacı kronik myeloid lösemi hastalarının tedavisinde birinci basamak tedavi olarak kullanılan imatinibe ileri safhalarda direnç geliştirmiş olan K562R kronik myeloid lösemi hücre hattında, kemoterapötik ajanların kullanımı nedeniyle oluşan reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırmak ve böylelikle DNA hasarlarının önüne geçmek için literatürde antioksidan aktivitesi bildirilmiş olan sığla yağının kullanımı araştırmaktır. Ayrıca bu çalışmada sığla yağının kullanılmasının otofaji aktivasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Direnç gösteren K562R hücrelerinde sığla yağının ROS'u azaltarak otofajinin aktivasyonunu sağladığı sonucuna ulaşılmıştır. Sığla yağının hematolojik malignitelerde kullanımına yönelik literatürde bildirilen bir çalışma olmaması bu çalışmayı özgün kılmaktadır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Hematopoetik Hücrelerin Gelişimi

Hematopoetik farklılaşma, bir organizmanın yaşamı boyunca gaz değişimi, yara iyileşmesi ve patojenlere karşı uygun bir savunma geliştirmede gerekli tüm kan hücrelerini oluşturmak için önemlidir (Montagner, Dehó, & Monticelli, 2014:3). Trombositler, eritrositler ve tüm lökositler dahil tüm kan hücrelerinin kökeni yetişkin kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerdir (hematopoietic stem cell (HSC'ler)). HSC'ler multipotent özelliktedir ve tüm kök hücreler gibi, kendini yenileme ve farklılaşma özelliğine sahiptirler (Staal, vd., 2016:1).

Yetişkinlerde kemik iliğinde HSC'ler uzun süreli kendini yenileyebilenler (long-term reconstituting HSCs (LT-HSCs)) ve kısa süreli kendini yenileyebilenler (short-term reconstituting HSCs (ST-HSCs)) olmak üzere iki grup hücreyi oluşturmaktadır. HSC'lerin bölünmesi sonucunda oluşan bu iki hücreden LT-HSC'ler; organizmanın tüm yaşamı boyunca sınırsız kendini yenileme özelliğini ve multipotent yeteneğini korurken, ST-HSC'lerin kendini yenileme özelliği sınırlıdır ancak farklılaşma özelliğini sürdürür. Bu hücrelere progenitor hücre denir (Montagner, vd., 2014:3).

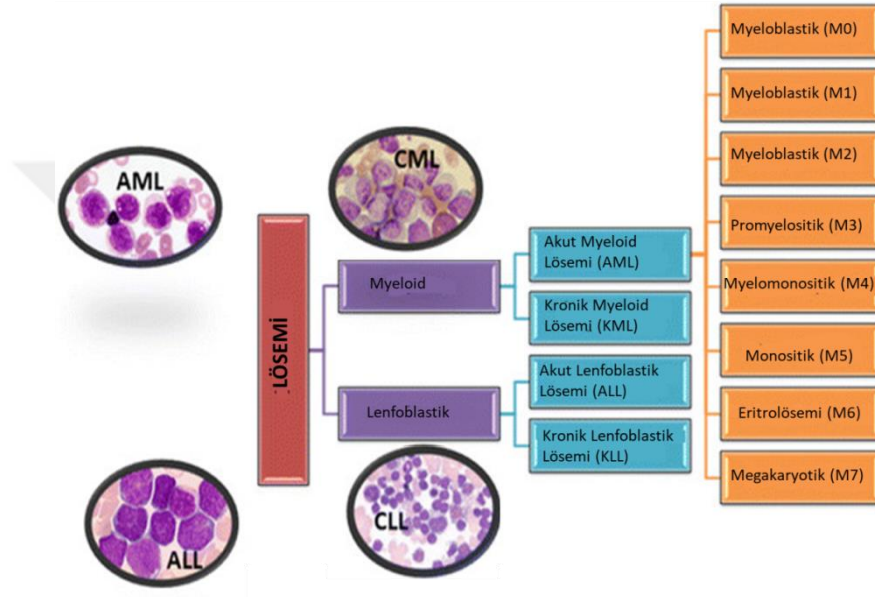


Şekil 2.1. Kemik iliğinde hematopoez.

Kaynak: (Du, Adam, Rani, Zhang, & Pang, 2008:4'den değiştirilerek alınmıştır.)

2.2. Lösemi

Lösemi, hematopoetik sistemi etkileyen malign bir neoplazmdır. Kemik iliğinde genel bir aşamanın ardından periferik kandaki lösemik hücrelerin ortaya çıkmasıyla deri de dahil olmak üzere vücudun çeşitli organlarında ekstrapredüller tezahür oluşabilir. Lösemiler, hastalığın biyolojik davranışına göre akut ve kronik lösemiler olarak sınıflandırılmasının yanısıra hücrelerin morfolojik, immünofenotipik ve sitogenetik özelliklerine göre de lenfoid veya miyeloid lösemiler olarak sınıflandırılır (Wagner, vd., 2012:1).



Şekil 2.2. Majör lösemi türleri

Kaynak: (Udensi & Tchounwou, 2014:7'den değiştirilerek alınmıştır.)

2.2.1. Kronik Myeloid Lösemi: Tanımı ve Tarihçesi

Kronik myeloid lösemi ilk olarak 1845'te tanımlanmıştır, 1960 yılında Nowell ve Hungerford tarafından Philadelphia (Ph) kromozomu olarak tanımlanan, lösemik hücrelerde tutarlı bir kromozomal anormallik sergilediği keşfedilmiştir. Philadelphia kromozomu, 9. Kromozomun uzun kolundaki ABL onkogeni ile 22. kromozomun uzun kolundaki BCR bölgesi arasındaki karşılıklı translokasyonun bir sonucu olan BCR-ABL füzyon geninden üretilir. BCR-ABL füzyon geni, KML vakalarının %90'ından fazlasında görülür. KML'nin sitogenetik özelliği 1973'te karşılıklı translokasyon t(9;22)(q34:11) olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, 1984 yılında, ABL (Abelson) proto-onkogeninin bu translokasyonda yer aldığı tespit edilmiştir. Kanser biyolojisindeki atılımlar, KML'nin kapsamlı bir şekilde

karakterizasyonuna ve şimdi kanserde bir 'model' olarak nitelendirilmesine yol açmıştır (Frazer, vd., 2014:7).

KML, Philadelphia kromozomu ile karakterize edilir ve karyotipin spesifik bir anormalliğinin lökojenogenez patojenik süreçleriyle bağlantılı olabileceği bir gen translokasyonu ile ilişkili ilk insan hastalığı malignitesidir (Udensi ve Tchounwou, 2014:7)

Söz konusu translokasyon ABL tirozin kinazı kodlayan genler ve BCR arasında bir füzyonla sonuçlanır. Oluşan füzyon protein yapıcı tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve hastalıkta neden olarak kabul edilir dolayısıyla imatinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri bu hastalığın başarılı tedavisi için kullanılır (Staal, vd., 2016:5).

2.2.2. Kronik Myeloid Lösemi Fazları

KML üç fazda ortaya çıkar: Kronik faz (CP)'in ardından akselere faz (AP) ve blastik fazın (BP) terminal aşamaları hastaların çoğunda gözlenmektedir (Deotare, vd., 2016:2). Hastaların çoğunluğu, başlangıçta kronik faz hastalığı olan, tedavi ile kolayca kontrol edilen ve ortanca süresi 3-4 yıl süren hastalardır. KML hastalarının çoğunda kronik fazdan blastik faz olarak adlandırılan bir akut lösemiye dönüşüm, etkili tedavinin yokluğunda kaçınılmazdır. Hastaların %70 ila %85'inde gelişen blastik kriz morfolojik olarak akut lösemiye benzer, ancak kemoterapiye çok dirençlidir. Bazı hastalarda, blastik faz ekstramedüller infiltrasyon ile karakterize edilir. Bu genellikle CNS (Merkezi Sinir Sistemi)'de, lenf düğümlerinde, deride veya kemiklerde görülür ve bazen kanda veya kemik iliğinde blastik transformasyon kanıtının yokluğunda ortaya çıkar. Bu vakaların çoğunda birkaç ay içinde hematolojik bulgulara rastlanmaktadır. Blastik fazdaki hastalar genellikle 3-6 ay içinde ölür. Hastaların %75 – 80'i ise blastik fazdan önce hızlandırılmış bir aşamadan geçmektedir. Akselere faz KML, genellikle ilerleyici olgunlaşma durması, hastalık dönüşümü ve mevcut tedaviye direnç ile ilişkili özelliklerin geliştirilmesini ifade eder. Bu özellikler arasında kan ve kemik iliği patlamaları veya bazofillerinde, sitogenetik klonal evrimde, ekstramedüller hastalığın ortaya çıkmasında, trombosit değerlerinde uçlarda artış, hastalığın kontrol altına alınmasında mevcut ilaçların artan gereksinimi ve tedaviye devam edilmesine rağmen splenomegali gelişmesinde artış görülmektedir. Her ne kadar bu akselere fazdan blastik faza geçme aşamasına geniş çapta alıntı yapılsa da, akselere faz KML'nin tanımı kesin değildir (Cortes, vd., 1988:1; Patel, vd.,2017:3). Çok değişkenli analizlerle 18 aydan kısa süren bir hayatta kalma ile ilgili spesifik kriterler akselere faz için önerilmiştir, bunlara periferik kanda > % 15 patlama veya kanda >%

30 patlama ve promyelositlerin varlığı da dahil edilmiştir. Kanda $> \% 20$ bazofil veya trombosit sayısı $< 100 \times 10^9 / L$ olması da akselere faz için kriterdir (Cortes, vd., 1996:4).

Hastalığın ilerlemesi genellikle periferik kandaki veya kemik iliğindeki patlamaların sayısı ile ölçülür. Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre, AP patlama sayısı $\%10$ ile $\%19$ arasındayken $\%20$ 'nin üzerinde olduğunda ise BP tanımlanmaktadır. Bununla birlikte, klinik uygulamada, dünya çapındaki klinisyenler rutin olarak AP için $\% 15-30$ ve BP için ise $\geq \% 30$ bir patlama sayısı kullanırlar. Hastaların $\%5$ 'inden daha azında tanı sırasında BP gözlenmektedir. KML'nin ilk sunumu BP'de ise, blast hücrelerinin üçte ikisi miyeloid olarak ve üçte biri lenfoid olarak bulunur; Megakaryositik veya promyelositik patlama krizi ise nadiren görülmektedir (Deotare, vd., 2016:2).

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

2.2.3. Kronik Myeloid Lösemi Epidemiyolojisi

KML, erişkin lösemi olgularının yaklaşık $\%20$ 'sini oluşturmaktadır. KML'nin yıllık insidansı 100.000 kişide 1-2 olarak görülmekte olup; tüm kanser türlerinde olduğu gibi erkeklerde daha sık (2:1) ortaya çıkmaktadır ve median tanı yaşı 45-55'tir. Kafkas etnik kökeninde daha yaygındır (Frazer, vd., 2007:1).

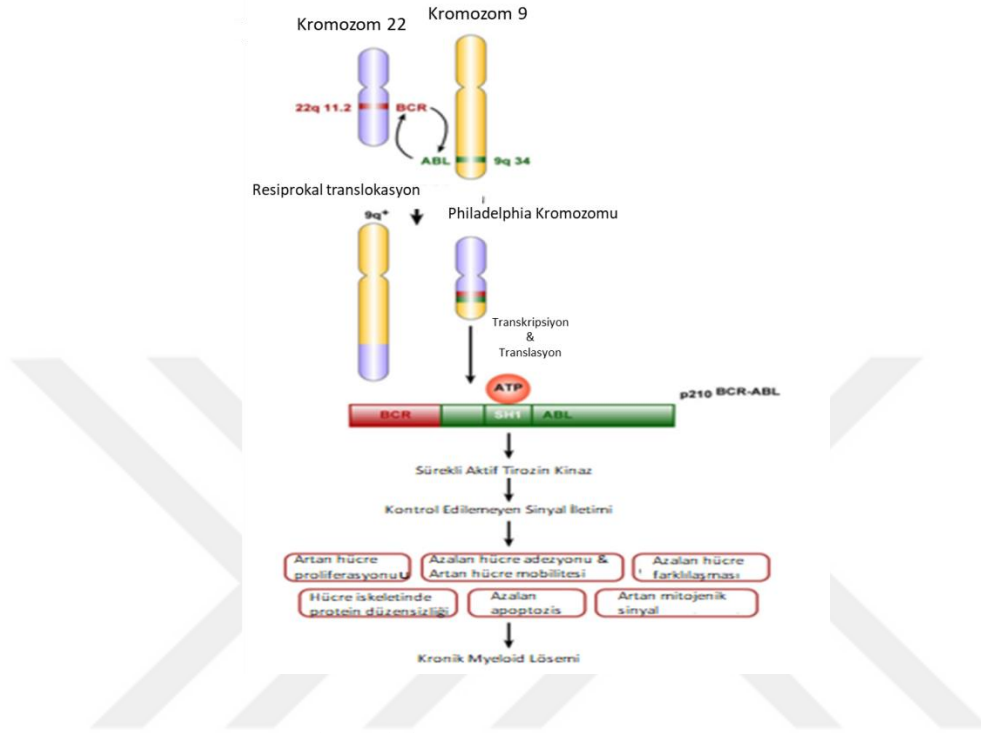
Kronik miyeloid lösemi için 5 yıllık nispi sağkalım oranı, 1970'lerin ortalarında teşhis edilen hastalar için $\%22$ iken 2008 ila 2014'te teşhis edilenler için $\%69$ 'a ulaşmıştır. 2019 kanser istatistiklerine göre çoğunlukla tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi edilen hastaların neredeyse normal bir yaşam sürdürdüğü görülmüştür (Siegel, vd., 2019:9).

2.2.4. Kronik Miyeloid Lösemi Patogenezi

2.2.4.1. Philadelphia kromozomu

Klasik KML, 9 ve 22 kromozomları arasındaki karşılıklı bir translokasyon ile karakterize edilir. Bu, kromozom 22 üzerindeki BCR geninin 5' ucu ile, kromozom 9 üzerindeki ABL-proto-onkogeninin 3' ucunun yan yana gelmesiyle oluşur. Ph kromozomu, kronik miyeloid lösemi (KML) 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. Füzyon mRNA farklı uzunluklardaki molekülleri üretilir ve değişken molekül ağırlıkları ile kimerik protein ürünlerine kopyalanır. En yaygın olanı p210 BCR-ABL olarak karşımıza çıkar (Frazer, vd., 2007:1; von Bubnoff, vd.,2003:1).



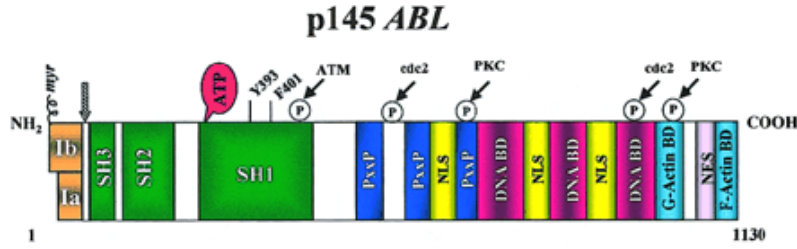
Şekil 2.3. Philadelphia kromozomu

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

2.2.4.2. ABL onkogeni

İnsanda bulunan c-ABL protoonkogeni Abelson fare lösemi virüsünde (Abelson Murine Leukemia Virus) bulunan v-ABL'nin homologudur. 9q34.1'de lokalize olan c-ABL geni, 230 kb uzunlukta olup, 11 ekzon içermektedir. Sitoplazma ve nukleusta saptanan ancak daha çok nukleusa lokalize olan 145 kDa bir reseptör olmayan kinaz proteini kodlar. Gen normal insan hücrelerinin tümünde ifade edilir. Abl proteininin hücre döngüsünün düzenlenmesi, stres yanıtları, integrin sinyali iletimi ve apoptoz süreçlerinde rol oynadığı gösterilmiştir. Birinci eksonun alternatif eklenmesiyle 1a ve 1b olarak adlandırılan iki form üretilir ve farklı promotor bölgeleri yönetilir. Hangi eksonun ifade edileceğine bağlı olarak 6 kb ve 7 kb olmak üzere iki farklı transkripsiyon ürünü mevcuttur. Bu iki mRNA farklı N-terminallere sahip proteinler kodlar. Bu izoformlar ise ABL (ABL) ve Arg (ABL2) olarak adlandırılırlar. Abl proteinlerinin N-terminal ucunda yüksek oranda korunmuş üç Src kinaz homoloji (SH) alanı bulunur. SH3 alanı prolin bakımından zengin dizileri tanıırken, SH2 alanı tirozin fosforile edilmiş peptitlere bağlanır. Kinaz veya SH1 domeni, ABL kinazlarında en

yüksek korunan bölgedir. ABL'nin C-terminalinde ise nükleer lokalizasyon sinyali (NLS), nükleer çıkış sinyali (NES) ve DNA bağlanma bölgesi bulunmaktadır. ABL kinaz bir kromozomal translokasyon olayının sonucu olarak, insan kronik myeloid lösemi rolü ile bilinir. ABL ile BCR genleri BCR-ABL onkoproteininin üretilmesini sağlar. BCR-ABL'deki BCR sarmal-bobin alanı ve Abelson murin lösemi virüsündeki gag dizileri oligomerizasyonu ve ABL kinazının kurucu trans fosforilasyonunu teşvik eder (Deininger, vd., 2000:1,2).



Şekil 2.4. Abl proteininin yapısal alanları

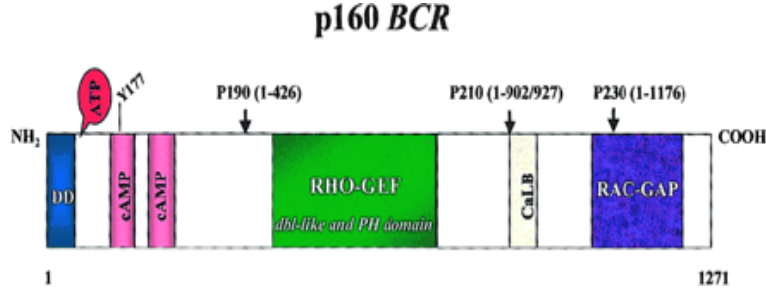
Kaynak: (Deininger, vd., 2000:2).

2.2.4.3. BCR geni ve proteini

BCR başlangıçta iyi tanımlanmış bir lösemi hasta grubunda bulunan bir kromozom anomalisi olan Philadelphia translokasyonunda yer alan bir gen olarak tanımlanmıştır. Bu translokasyonun bir sonucu olarak, BCR geninin bir kısmı, kronik miyelojen ve akut lenfoblastik lösemilerin gelişmesinden sorumlu olan Bcr / Abl füzyon proteinlerini üreten, c-Abl protein-tirozin kinazı kodlayan gen olan ABL'ye bağlanır (Chuang, vd., 1995).

BCR geni, 22. kromozom üzerinde bulunur ve sürekli eksprese edilerek 160 kD ağırlığında bir proteini üretir. İlk N-terminal ekzonu bir serin-treonin kinazı kodlar. 14-3-3 protein ailesinin bir üyesi olan Bap-1 ve Bcr proteinleri bu kinazın substratlarıdır (Deininger, vd., 2000:1).

Yapısal olarak, p160 BCR, tanımlanmış üç fonksiyonel alandan oluşur. Amino terminus, serin ve / veya treonin kalıntıları üzerinde BCR'yi fosforile eden bir kinaz aktivitesi içerir. Proteinin merkezi kısmı, Rho ve CDC42H'lerde guanin nükleotit değişimini katalize eden, protoonkogen ürün Dbl'in guanin nükleotit ayrışma (GDS) bölgesi ile homolojiye sahiptir. BCR'nin karboksil terminali, Rho ailesinin üyeleri tarafından GTP hidrolizini uyarıcı GTPaz-aktive edici proteinlerin (GAP) katalitik alanına homologdur. Bu sayede BCR, potansiyel olarak bir molekül içinde birleştirilen küçük GTP bağlayıcı proteinlere (GDS ve GAP) yönelik iki zıt düzenleyici aktiviteye sahip olan benzersiz bir yapıya sahiptir (Chuang, vd., 1995:1).



Şekil 2.5. Bcr proteininin yapısı

Kaynak: (Deininger, vd., 2000:2).

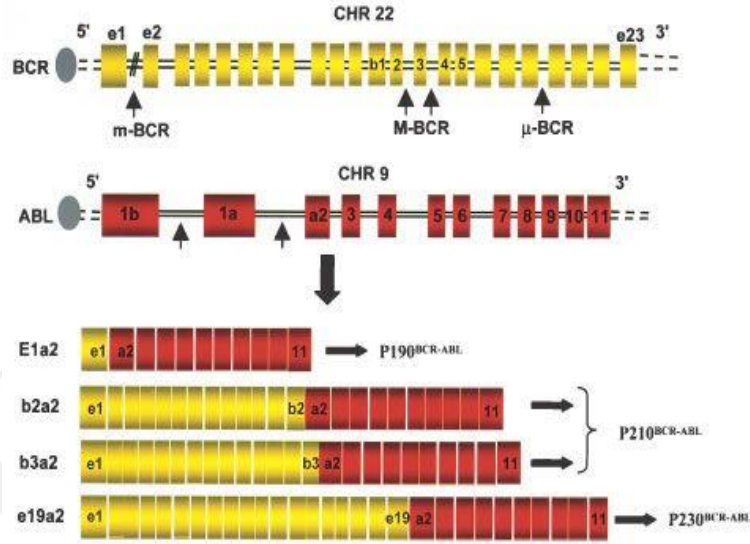
2.2.4.4. BCR-ABL füzyon geni ve füzyon proteini

BCR-ABL füzyonunun etkinliği tüm lösemik hastalarda tam olarak aynı değildir. Örneğin, bazıları uzun gecikme süresine sahipken, bazı vakalar hastalığın gelişmesinden önce çok kısa gecikme süresi ile bulunmuştur. Aktivitedeki bu farkın sebebinin, BCR-ABL füzyon geninde BCR geninin varyasyonlarından kaynaklandığı bulunmuştur. Temel olarak, iyi tanımlanmış üç kesme noktasının gen füzyonunda rol oynadığı bildirilmiştir. Bunlar; ilk intronda minör BCR (m-BCR), 12-16 ekzonlar arasında majör BCR (M-BCR) ve 19. İntronda mikro BCR (μ -BCR) olarak adlandırılan farklı molekül ağırlığına ve farklı kinaz aktivitesine sahip üç farklı onkoproteinle sonuçlanmıştır. p190 (190 kDa), p210 (210 kDa) ve p230 (230 kDa), sırasıyla M-BCR, m-BCR ve μ -BCR ile ABL füzyonu tarafından üretilen üç kimerik protein olarak bulunmuştur (Kunnumakkara, vd., 2017:2,3).

Hemen hemen tüm KML hastalarında BCR genindeki kırılma noktaları majör BCR (MBCR) içinde bulunur. Alternatif ekleme nedeniyle, b2a2 veya b3a2 birleşimiyle füzyon transkriptleri üretilebilir. BCR-ABL füzyon geni, ABL alanı, KML hücrelerinin aşırı proliferasyonuna yol açan aktivasyon için adenosin trifosfat (ATP) bağlaması gereken BCR-ABL proteinini üretmek üzere çevrilir (Hoshiko, vd., 2019:1).

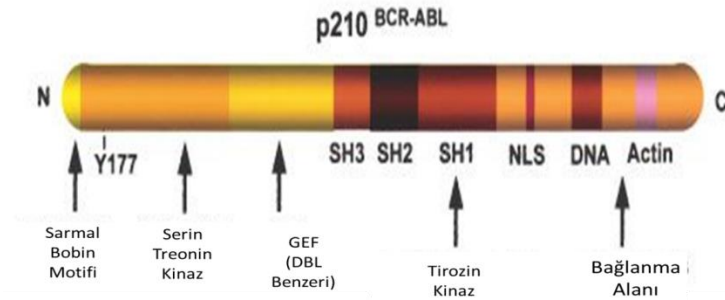
9q34'teki ABL geni içindeki kesme noktaları, birinci alternatif ekson 1b'nin yukarısında, ikinci alternatif ekson 1a'nın aşağısında, ya da daha sık olarak, arasında, 5' ucunda büyük bir alanda (300 kb'den büyük) herhangi bir yerde oluşabilir. Kimerik proteindeki Abl kısmının neredeyse değişmez bir şekilde sabit olduğu gözlemine dayanarak, BCR kısmı büyük ölçüde değiştiği halde, ABL'nin dönüştürme prensibini taşımasının muhtemel olduğu, ancak BCR dizisinin farklı boyutlarının, hastalığın fenotipini dikte edebileceği sonucuna varılmıştır (Deininger, vd., 2000:1,2).

P190'ın kinaz aktivitesi, hastalık fenotipleri ile korele olan p210'dan çok daha büyüktür. P190'ın esas olarak ALL ile ilişkili olduğu ve yüksek tirozin kinaz aktivitesinden dolayı kötü prognoz ile sonuçlandığı, p210'un ise KML ile daha fazla ilişkili olduğu bulunmuştur (Kunnumakkara, vd., 2017:3).



Şekil 2.6. Kesme noktalarının ABL ve BCR genlerindeki yerleri ve çeşitli kesmelerden türetilen kimerik BCR / ABL mRNA transkriptlerinin yapısı

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

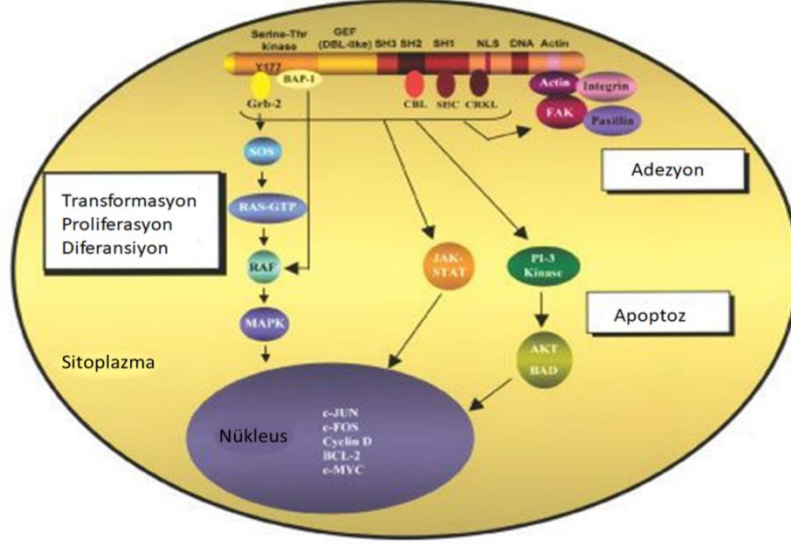


Şekil 2.7. P210 BCR / ABL'nin fonksiyonel alanları

Kaynak: (Salesse & Verfaillie, 2002:3'ten değiştirilerek alınmıştır.)

P210^{BCR} / ABL¹'nin artan tirozin kinaz aktivitesi, birkaç hücrel substratın fosforilasyonuna ve ardından birkaç adaptör molekülü ve proteinin bağlanmasını indükleyen p210^{BCR} / ABL¹'nin otofosforilasyonunu sağlar.

Bir çok sinyal yolunun p210^{BCR / ABL} ile aktive edilmesi, hücre çoğalmasının kontrolü ve farklılaşması, yapışma ve hücre sağkalımı gibi temel hücresel işlemlere müdahale ederek kötü huylu transformasyona yol açar (Salesse ve Verfaillie, 2002:2)



Şekil 2.8. P210 BCR / ABL'nin sinyal yolları

Kaynak: (Salesse & Verfaillie, 2002:3'ten değiştirilerek alınmıştır.)

p210^{BCR / ABL}, RAS / MAPK, PI-3 kinaz, c-CBL ve CRKL yolları, JAK-STAT ve Src yolu gibi sinyal iletim yollarını aktive eder. Bunlardan, RAS, Jun-kinaz ve PI-3 kinaz yolaklarının dönüşüm ve proliferasyonda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Apoptozisin inhibisyonunun, PI-3 kinaz ve RAS yolaklarının aktivasyonundan, c-myc ve BCL-2'nin AKT'si boyunca induksiyonla sonuçlandığı düşünülmektedir (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).

2.2.5. K562 Hücre Hattının Karyotipi

Kronik miyeloid lösemnin kronik bir fazdan akut faza dönüşmesine sıklıkla ek kromozom değişiklikleri eşlik eder. Kapsamlı kromozom G-bantlı çalışmalar, ikincil değişikliklerin rastgele olmadığını ve sıklıkla trizomi 8, izokromozom 17q, trizomi 19 veya

Philadelphia kromozomunun ekstra bir kopyasını içerdiğini ortaya koymuştur. Bu ikincil kromozom değişikliklerine ek olarak, karmaşık yapısal yeniden düzenlemeler sıklıkla geleneksel G-bantlı analizle tanımlanamayan işaret yapılarını oluşturmak için meydana gelir. KML'den türetilen hücre çizgisi, K562, ilk olarak 1975'te kurulduğundan beri araştırmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Gribble, S. M., vd., 2000:1). Philadelphia kromozomu, KML vakalarının %90'ında görülür. Kalan durumlarda, üç, dört veya beş kromozomun dahil olduğu karmaşık translokasyonlar mevcuttur (Naumann, S. Vd., 2001:1).

K562 hücre dizisinin kromozomlarının ayrıntılı olarak karakterize edilmesi amacıyla sitogenetik araştırmalar yapılmıştır. Lozzio ve Lozzio kısa süreli kültürlerde hipodiploid karyotipli bir t (15; 17) 'den türetilmiş olarak yorumlanan bir Ph kromozomu ve uzun bir akrosantrik işaret bulmuşken, uzun süreli kültürler triploid yakın bir karyotip göstermiştir (Lozzio, C. B., & Lozzio, B. B. 1975:1).

K562 hücre hattında 20 ayrı K562 hücresinin analizi çalışmasında da, tüm hücrelerin triploide yakın bir karyotip sergilediğini ve çoklu yapısal anormalliklerle karakterize edildiği gösterilmiştir. Triploid durumunun lökemogenez sırasında veya hücre hattının kurulmasının erken aşamalarında ortaya çıktığı ve farklı laboratuarlarda pasajlanan farklı K562 hücre hatlarının bazı ek karyotipik farklılıklar gösterebileceği düşünülmektedir. K562 hücre hattındaki tüm kromozomlar için karyotip, önceki karyotip analizleri tarafından desteklenmesine rağmen, en fazla değişkenliği gösteren 10, 12 ve 21 numaralı kromozomlardaki hafif varyasyonlardır (Zhou, B., vd., 2019:3).

Collins ve Groudine bir Ph pozitif hiperdiploid karyotip bulmuşlardır (Collins, S. J., & Groudine, M. T., 1983:3). Yapılan bir çalışmada, K562'nin karyotipi, FISH, M-FISH, CGH ve G-bandı ile detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. M-FISH ile iki markör kromozom (M11, M13) saptanmıştır. G-bantlama, MFISH, FISH ve CGH ile birleşik analizi, 21 benzersiz markör kromozomu ile bir hipotriploid karyotip ortaya çıkarmıştır. Bu karyotip, G-bantlama ile analiz edilen 51 hücreden 40'ında bulunmuştur (Naumann, S., vd., 2001:4).

2.2.6. KML Tedavisi

Kronik miyeloid lösemi ilk tanınan lösemi türüdür. 1841'de Glasgow'da David Craigie'in ateş, splenomegali ve lökositözlu bir hasta görmesi ve bundan 3 yıl sonra ikinci bir benzer hastayı görmesiyle, meslektaşı ve bir patolog olan John Hughes Bennett'in otopsi yapmasına ve 1845'te Edinburgh Tıp ve Cerrahi Dergisi'nde bulgularını tanımlamasına yol açmıştır. Aynı zamanda Rudolph Virchow, Berlin Charite Hastanesi'nde benzer bir hasta

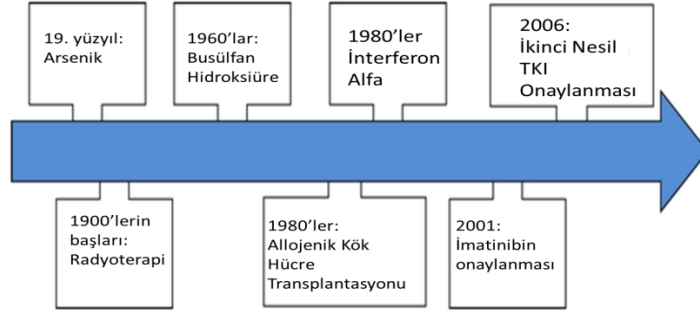
görmüş ve bu hasta 4 ay sonra ölmüştür. Virchow dalağın otopsi genişlemesinde dikkat çekti. Raporu, Bennett'in gazetesinden 5 hafta sonra Almanca olarak yayınlandı. Her iki makalenin de, 1842,3'te Paris'teki Alfred Donne'den neredeyse kesin olarak lösemnin ne olduğunu açıklayan bir raporundan önce geldiğine dikkat çekmekte fayda var (Goldman, 2010:1).

KML'de tedavi kararları hasta yaşı ve hastalığın evresine dayanmaktadır. Başlangıçta çoğu hasta WBC sayısının hızlı kontrolünü sağlamak için hidroksiüre ile sitoredüktif kemoterapi alır. Busulfan, etkili hematolojik kontrol sağladığı gösterilen ilk ajandı. Daha sonra alloSCT ile tedavi edilen hastaların sonuçlarını olumsuz yönde etkileyen Busulfan'ın, hastanın hayatta kalmasıyla hidroksiüre ilişkisine göre daha düşük olduğu ve önceden tahmin edilemeyen miyelosupresyon ve organ fibrozisine neden olabileceği gösterilmiştir. Busulfan, alloSCT preparatif rejim için mükemmel bir bileşendir. Ancak bu ayarın dışında yalnızca zaman zaman kullanılmalıdır. Hydroxyurea 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 geçişini değiştirmez. Hidroksiüre, diğer daha kesin 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. 30 ila 40 yaşın altındaki hastalar hastaliksız sağkalım (DFS) oranlarını % 60-80, 1 yıllık TRM oranlarını % 5-20'den az ve %20'lik nüks oranlarına sahiptir. Sonuç yaşlılıkta kötüleşir. Geniş bir seri içeren çalışmalar, 50 yaşından büyük hastalarda 5 yıllık sağkalım oranlarını % 30-40 olarak bildirmiştir. Avrupa Kemik İliği Transplantasyonu Kayıt Defteri (EBMTR) 45 yaşından büyük hastalarda % 47'lik bir TRM ve % 25'lik 5 yıllık bir DFS bildirmiştir. Kronik fazda nakledilen hastalar, blastik fazda nakledildiklerinde, % 15 ila % 40-60 arasında tahmini bir DFS'ye sahiptir. 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, KML tedavisinde devrim yaratmış ve imatinib mesilat, 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 2.9. KML Tedavisinin Zaman Tablosu

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

2.2.6.1. KML tedavisinde TKİ kullanılması

Miyeloproliferatif bir hastalık olan kronik miyeloid lösemi, tüm lösemilerin yaklaşık %10'unu oluşturmakta ve her yıl 8,430 yeni bir vaka gözlenmektedir. Hidroksiüre ve interferon- α gibi önceki birkaç tedavinin klinik etkisi tatmin edici olmadığından tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKİ'ler) gelişimi, KML'nin tedavisinde devrim yaratmıştır ve TKİ tedavisi alan KML'li hastalar, genel popülasyonun neredeyse tamamı kadar yaşamaktadır (Pan, vd., 2019:1).

2.2.6.2. Birinci nesil TKİ: İmatinib

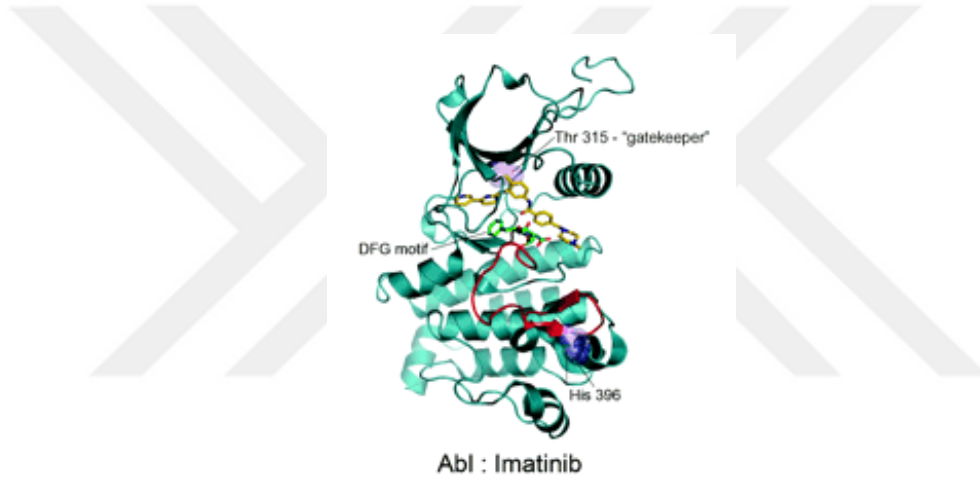
İmatinib mesilat (IM), KML hastalarında ön tedavi için ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 2002 yılında onaylanmış spesifik bir tirozin kinaz inhibitörüdür ve KML hastaları için standart birinci basamak tedavidir. Bununla birlikte, ana imatinib direnci ve devam eden hastalığın moleküler kanıtı % 20-25 oranında imatinib tedavisi alan hastalarda gözlenmiştir (Bhamidipati, vd., 2013:1; Mirza, vd.,2019:1).

Tirozin kinaz inhibitörleri çoğu hastada KML'yi yönetilebilir bir hastalığa dönüştürmüştür ancak TKİ direnci ve intoleransı hala ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, başarılı tedavi için neoplastik hücre ölümünü artıran alternatif terapötik yaklaşımlar gereklidir (Hoshiko, 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 ortanca 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, BCR/ABL'de ilaca direnç gösteren mutasyonların birikmesi zamanla ortaya çıkan ciddi bir problemdir. Bu hastalarda direnç olgusu, BCR/ABL'in ABL kinaz bölgesine eşlenen bir veya daha fazla nokta mutasyonunun edinimi ile bağlantılı olmuştur. T315I mutasyonu, imatinib tedavisi alan hastalarda bulunan en yaygın mutasyonlardan biridir ve dirençli vakaların %15'inden sorumludur. Thr³¹⁵, 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 2.10. Abl'de imatinib bağlanma bölgesinin merkezinde Thr315 gatekeeper gösterilmesi

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

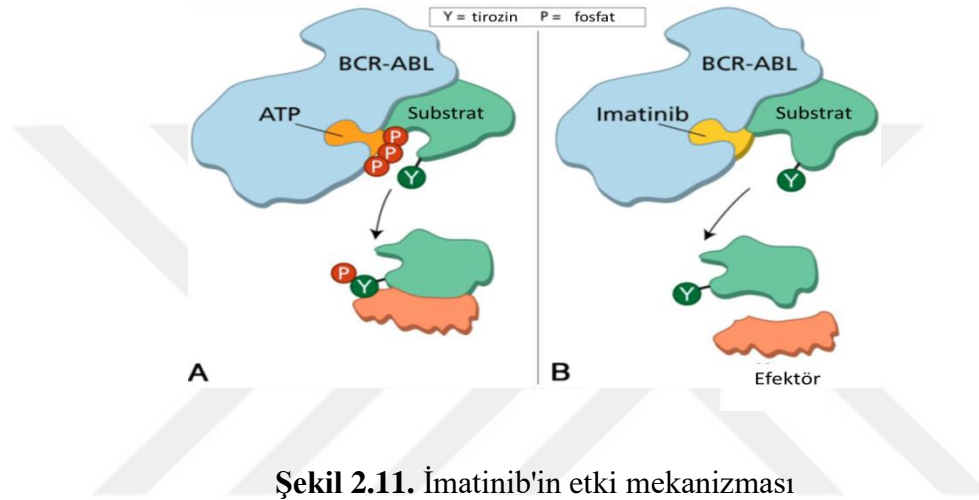
Bu mutasyonların bazıları imatinib bağlanma bölgesine yakın olmasına rağmen, mutasyonların çoğu distal pozisyonlarda gerçekleşir. Bu mutasyonlarla direncin uyarılması için makul bir mekanizma, kinaz bölgesinin katalitik yeteneklerinin birlikte korunmasıyla birlikte aktif olmayan konformasyonun dengesizleştirilmesini içerir (Young, vd., 2006:2).

Bcr/Abl füzyon proteininin varlığı KML'yi geleneksel terapötik yaklaşımlara karşı dirençli kılar, bu da BCR/ABL'yi önemli bir terapötik hedef haline getirir. Imatinib (STI571, Gleevec, Novartis), BCR/ABL'nin ATP bağlayıcı cebini işgal ederek tirozin kinaz aktivitesini etkili bir şekilde inhibe eder, böylece sonraki sinyal iletimini ortadan kaldırır. Bununla birlikte, imatinib direnci zamanla gelişir ve KML hastaları için ortaya çıkan bir sorundur. Edinilmiş klinik 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 (P-halkası) işgal eder ve böylece ATP'ye erişimi önler, böylece herhangi bir substratın fosforilasyonunu önler; imatinib ayrıca kinaz bölgesinin P-loop dışındaki kısımlarıyla da temas eder (Mughal, T. ve Goldman, 2006:4).



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

Şekil 2.11'de bir substratın fosforilasyonu şematik olarak gösterilmiştir. ATP, cebi Bcr/Abl onkoproteininin ABL bileşeninde işgal eder. Substrat daha sonra kendisini Bcr/Abl onkoproteininden ayırır ve bir başka downstream efektör molekülü ile fonksiyonel temas sağlar. 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).

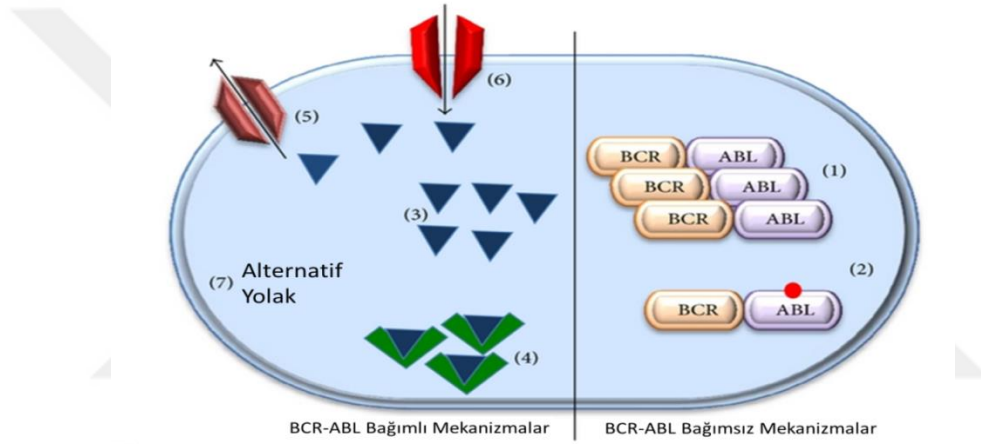
İmatinib direnci ve etkili mekanizmalar;

İmatinib mesilat kullanımıyla kronik fazdaki hastaların yaklaşık %80'inin, 12 aylık tedavi süresince tam bir sitogenetik remisyona ulaştığı kanıtlanmıştır (Dong, vd., 2019:1)

Tedavi edilen kronik faz KML hastalarının %95'inde tam bir hematolojik remisyon ve %60'ında majör sitogenetik bir yanıt görülmesine rağmen, KML blastik krizdeki hastalarda ve Ph⁺ ALL hastalarında remisyonlar kısa sürelidir ve ilaca karşı direnç gelişmektedir. İmatinib direnci, kronik fazda KML'li hastaların %3 ila 4'ünde görülmektedir. Ve tedaviyi takiben 3 ay içerisinde tam hematolojik yanıt (CHR), 6 ay içerisinde herhangi bir sitogenetik cevap veya

12 ay içinde majör sitogenetik cevap ($Ph + \leq\% 35$) veya sitogenetik veya hematolojik relaps gelişimi gözlenmez (Corbin, vd., 2003:1; Kantarjian, 2019:1; von Bubnoff, vd., 2003:1).

Bazı hastalar tedavinin başlangıcında cevap vermemekle birlikte hiçbir zaman tam bir hematolojik, sitogenetik veya moleküler tepkiye de ulaşamayabilir. Bu durum, imatinib'e karşı birincil direnç olarak adlandırılmaktadır. Tedaviye başlangıçta yanıt veren hastalarda ise belli bir süre sonra yanıtı kaybedilebilir. Bu durumda ise ikincil direnç geliştiği söylenir. BCR/ABL bağımsız mekanizmaları ve BCR/ABL bağımlı mekanizmalar olmak üzere iki ana direnç mekanizması grubu vardır. BCR/ABL'ye bağlı direnç mekanizmaları, yüksek bir ABL kinaz aktivitesine neden olabilecek BCR/ABL onkojenin çoğaltılmasını veya aşırı çoğaltılmasını içerir (Hamad, vd., 2013:4).



Şekil 2.12. Direnç mekanizmaları

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

1. Gen amplifikasyonu
2. Gen mutasyonu
3. İlaç konsantrasyonu
4. İlaç bağlanması
5. İlaç efflux
6. İlaç influx
7. Alternatif sinyal yolları

En yaygın olarak tanımlanan imatinib direnci mekanizması, BCR/ABL kinaz bölgesi içindeki mutasyonlardır ve nüks ile ilişkili en yaygın olarak tanımlanmış mekanizmadır. Bcr/Abl onkoproteinde imatinib etkisinin etkisiz kaldığı 55'in üzerinde mutasyon türü

tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar, imatinibin bağlanma bölgesini veya onkoproteini değiştiren bölgeleri, imatinibin bağlanamadığı aktif formuna etkiler. BCR/ABL'nin en yaygın mutasyonlarından biri, ABL geninde bir tek nükleotit ikamesi olan T315I mutasyonu, aminoasit 315'te bir treonin ile izolösin ikamesi ile sonuçlanır (Thr315-Ile315; T315I) Bu mutasyon, imatinibin sterik engel nedeniyle bağlanma için gereken bir oksijen molekülünün elimine edilmesi 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 olsa da tespit edilmiştir (Corbin, vd., 2003:1).

BCR/ABL bağımsız mekanizmaları imatinib'e karşı ikinci ana direnç kategorisidir. Bunlar, ilaç efflux, ilaç influx, ilaç bağlama veya ilaç konsantrasyonu ile ilgili komplikasyonlar nedeniyle hücre içi imatinib seviyesinde bir azalmaya yol açabilir (Hamad, vd., 2013:5).

2.2.6.3. İkinci nesil TKİ'ler ve etki mekanizmaları

İmatinib direncinin ortaya çıkması, tedaviye tahammülsüzlük ve hastaların terapötik cevap eksikliği, ikinci nesil TKİ'nin gelişmesine neden olmuştur (Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib) (Hamad, vd., 2013:3).

Dasatinib (eski adıyla BMS-354825), ikinci nesil TKİ'dir. FDA tarafından 2007 yılında kronik faz KML hastaları için ikinci basamak tedavi seçeneği olarak onaylanmıştır. Dasatinib, BCR/ABL'nin ATP bağlanma yerine imatinib'den daha güçlü bir şekilde bağlanır. Sadece ABL kinaz bölgesinin aktif olmayan konformasyonuna bağlanan imatinibin aksine, dasatinib, hem aktif hem de inaktif BCR/ABL durumlarına bağlanma yeteneğine sahiptir. Dasatinib, yalnızca BCR/ABL kinaz aktivitesi üzerinde değil, Src ailesi, c-Kit, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ve ephrin-A reseptörü gibi diğer onkogenik kinazlarda da geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Dasatinib, çoğu imatinib dirençli ABL mutasyonuna etki eder, ancak T315I'ye etki etmez. Dasatinib tedavisi ile ilişkili önemli bir olumsuz etki, hastaların% 14,3'ünde meydana gelen ancak başarılı bir şekilde yönetilen plevral efüzyonlardır (Hamad, vd., 2013:3).

Nilotinib (eski adıyla AMN107), 2007'de kronik faz KML hastalarının ikinci basamak tedavi seçeneği olarak FDA onaylanmış ikinci nesil bir TKİ'dir. imatinib aktivitesinin moleküler mekanizmasının anlaşılmasına dayanarak, yapısal modifikasyonlar nilotinibin

gelişmesine neden olmuştur. imatinib gibi nilotinib de, ABL kinaz bölgesinin aktif olmayan bir DFG-dışarı konformasyonuna bağlanarak BCR/ABL'yi inhibe eder, böylece enzimin katalitik olarak aktif konformasyonu benimsemesini ve BCR/ABL sinyal transdüksiyonunda yer alan proteinlerin tirozin fosforilasyonunu bloke etmesini önler. (Kantarjian, 2019:1).

Bosutinib (eski adıyla SKI-606), KML hücre hatlarına karşı imatinib'den daha etkili olduğu kanıtlanan ikinci nesil TKİ'dir. Bosutinib, V299L ve T315I dışındaki birçok imatinib dirençli mutasyona karşı aktiftir. İshal ve yüksek karaciğer enzimleri, bosutinib'in baskın yan etkileridir (Hamad, vd., 2013:4).

2.2.6.4. Üçüncü nesil TKİ: Ponatinib

KML tedavisinde oral hedefe özel ilk ajan olan imatinib, hastalığı uzun remisyon dönemleri olan kronik bir hastalığa dönüştürmüştür. KML'nin ilk tedavisi olarak imatinibin onaylanmasından sonra; dirençli KML hastalarının tedavisi için ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ), bosutinib, ponatinib ve TKİ olmayan omasetaksin 2012 yılında onaylanmıştır (Balcı Güçlü, A. G., vd., 2020:2). Ponatinib (AP24534), BCR/ABL'yi mutasyonlarla, özellikle imatinib, dasatinib, nilotinib ve bosutinib gibi diğer TKİ'ye karşı direnç sağlayan T315I ile inhibe etmek için tasarlanmış oral olarak uygulanan bir TKİ'dir. Ponatinib, M244V, G250E, Q252H, Y253F / H, E255 K / V, F317L, M351T ve F359V'yi içeren doğal ve mutasyonlu BCR/ABL'yi inhibe eder. Ponatinib'in karakteristik karbon-karbon üçlü bağının varlığı ile metilfenil ve pürin grupları sterik girişim olmadan T315I mutasyonuna bağlanmasına izin vermektedir (Hamad, vd., 2013:4). Tablo 1'de birinci, ikinci ve üçüncü nesil TKİ'lerinin T315I mutasyonu üzerinde etkili olup olmadığı özet olarak gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Tirozin kinaz inhibitörlerinin özeti ve bunların T315I üzerindeki etkileri

TKİ	Orijinal Adlandırma	TKİ jenerasyonu	T315I mutasyonu üzerine etkisi
Imatinib	STI571	Birinci	Hayır
Dasatinib	BMS-354825	İkinci	Hayır
Nilotinib	AMN107	İkinci	Hayır
Bosutinib	SKI-606	İkinci	Hayır
Ponatinib	AP24534	Üçüncü	Evet

Kaynak: (Hamad, vd., 2013:3'ten değiştirilerek alınmıştır.)

2.3. *Liquidambar orientalis* (Sweetgum Oil, Sıgla Yağı)

Liquidambar türleri Hamamelidacea familyasına ait bir türdür. *Liquidambar orientalis* ağacı ise Türkiye'de 'Sıgla ağacı' veya 'Günlük ağacı' olarak bilinmektedir. *L. orientalis*, tıbbi ve kozmetik özelliklere sahip olduğu bilinen otsu bir bitkidir (Okmen, vd., 2014:1).

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



Şekil 2.13. *Liquidambar orientalis*'in Türkiye'deki yayılış alanları

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

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

Sıgla yağı %45 oranında fenolik bir bileşik olan sinnamik asit içermektedir. Sinnamik asit içeren bitki ekstraktları ve propolis ile yapılan çalışmalarda bu maddenin antioksidan, antibakteriyel ve antiinflamatuvar özelliği gösterilmiştir. Yine bu çalışmalarda sinnamik asidin bazı hücreleri lipid peroksidasyonundan ve çeşitli oksidatif toksinlere bağlı olarak ortaya çıkan hasardan koruduğu da gösterilmiştir. İnsanlar üzerindeki farmakokinetiği hakkında çok detaylı bilgiler bulunmamasıyla birlikte sıgla yağı; sinnamik asit ile antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal etki gösterdiği düşünülmektedir (Aydınöz ve Bulut, 2014:4).

Sığla yağının çıkartılması;

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

2) Ağaçlar bir ay süreyle bu şekilde bırakılır. Mayıs ayı sonunda kaşık adı verilen aletle yaraların açılmasına başlanır. Damar adı verilen bu yaralar dış kabuk, diri kabuk, kambiyum ve çok az miktarda da diri oduna girecek şekilde açılır.

3) Bir hafta sonra yaralar tazelenir ve bu işleme sur adı verilir. Bu işlemden iki hafta sonra, damarlar içinde biriken yağ kaşıktaki sıyrılarak alınır ve buna da sur arkası denir. Bundan sonra esas sığla yağının alınması işlemine geçilir.

4) Bu işlem temmuz ayı ortasından ekim ayı sonuna kadar sürer. Bu süre içinde, her on beş günde bir yaralar üzerinde biriken yağ, kabuk ve odun tabakalarıyla birlikte kaşıkla yontularak alınır.

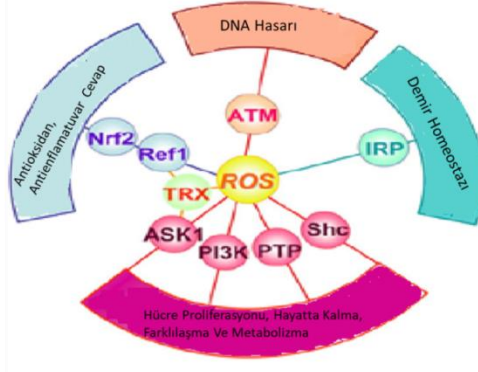
5) Bunlar işçilerin önlerine astıkları torbalar içerisinde toplanır. Bu işleme sefer adı verilir. Kapçık adı verilen yağ ile birlikte kabuk ve odun içeren yongalar bakır kaplarda, su içerisinde 30-90 dk süreyle kaynatılır.

6) Sonra kaynatılan yongalar saplı yabalarla kazınılarak keçi kılından yapılmış torbalara konur. Bu torbalar preslerle sıkıştırılarak 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 (Aydingöz ve Bulut, 2014:2)

2.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri (ROS), mitokondriyal oksidatif metabolizmanın veya NADPH oksidaz enzimlerinin bir yan ürünü olarak üretilen hücrel moleküllerdir. 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). Kimyasal olarak oksijenden daha aktif olan ROS hücrel homeostaz ile ilişkilendirilmektedir. ROS, normal konsantrasyonlarda; hücrelerin büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen çeşitli sinyal iletim olaylarında rol oynayan önemli ikinci haberciler olarak görev yapmaktadır (Y. F. Chen, vd., 2017:2).



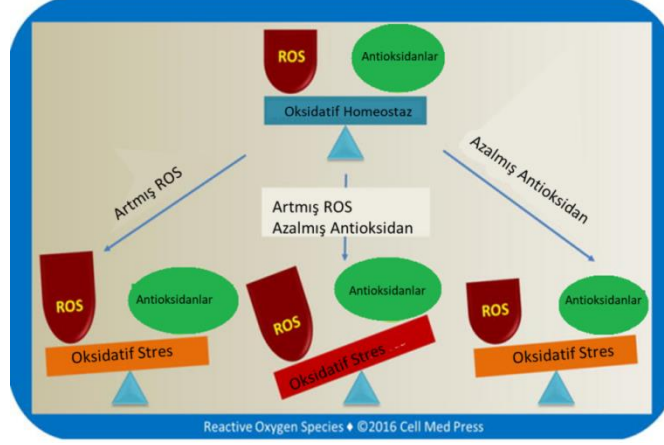
Şekil 2.14. ROS tarafından düzenlenen hücresel sinyal yolları

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

Reaktif oksijen türleri her yerde bulunmakta ve hücre sel sinyallemde önemli bir rol oynamaktadır. ROS sinyallemesinin birçok yönü, kanser indüksiyonu ve ilerlemesine katkıda bulunabilmektedir. Ancak en doğrudan ilişkilendirme genomik instabilitedir ve neredeyse tüm kanser hücrelerinde genomik instabilite gözlenmektedir. Genomik instabilite, genomdaki DNA mutasyonlarının ve kromozomal yeniden düzenlemelerin tümü olarak tanımlanmaktadır. Bu değişiklikler DNA hasarlarından kaynaklanmaktadır. Kansere bağlı olarak gözlenen ROS sadece DNA'ya değil, aynı zamanda DNA onarım proteinlerine 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 göre daha yüksek ROS üretim seviyelerine sahip olmalarından dolayı kanserle ilişkili olduğu yaygın olarak kabul edilmiştir. ROS üretiminin artması, genomik instabilite ve DNA hasarı ile ilişkilendirilmesinin yanı sıra hücre proliferasyonunu ve hücre göçünü teşvik etmek için bir sinyalleme fonksiyonunu gerçekleştirerek lösemik hücre dönüşümüne katkıda bulunmaktadır (Mi, vd., 2018:1,2).

Oksidatif stres (OS), reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile antioksidan savunma sistemlerinin tepkisi arasındaki dengesizlikten kaynaklanan hücre sel ortam koşullarını ifade etmektedir. ROS kısa ömürlü yüksek reaktif moleküllerdir ve OS'nin ilerlemesinde kritik bir rol oynamaktadır (Zhang, vd., 2018:1).



Şekil 2.15. Oksidatif stresin şematik gösterimi

Kaynak: (Li, Y. R., & Trush, M., 2016:14'ten değiştirilerek alınmıştır.)

Gösterildiği gibi, oksidatif stres, ya reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmış oluşumundan ya da antioksidan savunmanın azalmasından ya da her ikisinden kaynaklanır. Oksidatif stresi redoks sinyalinden ayırt etmek önemlidir. Oksidatif stres, artmış ROS'un potansiyel zararlı etkilerini vurgularken, redoks sinyali, ROS'un fizyolojik tepkilere yol açan hücre sinyal transdüksiyonuna katılımını vurgular (Li, vd., 2016:14).

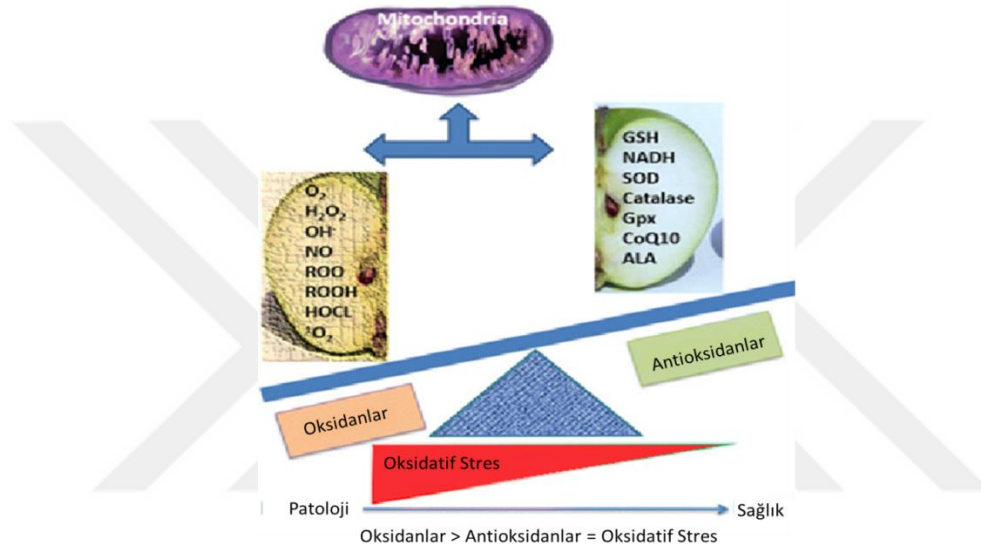
Hematopoietik hücrelerde hidrojen ile indüklendiğinde oksidatif stres oluşmaktadır ve BCR/ABL ekspresyon eden hücrelerde anti-apoptotik ve proliferatif sinyalleme ile KML'ye neden olmaktadır. KML'nin ilerlemesi ise küçük moleküler ağırlıklı antioksidanlar dahil olmak üzere ROS seviyelerini modüle eden kimyasallardan etkilenebilmektedir. İmatinib ve diğer TKİ'lerinin, BCR/ABL-pozitif hücrelerde ROS seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Ancak bu etki yetersizdir. Bu nedenle, TKİ'lerle KML tedavisi, ROS temizleyicileri kullanılarak güçlendirilebilmektedir (Antoszewska-Smith, vd., 2017:5).

Reaktif oksijen türleri, DNA'ya doğrudan veya ara maddeleri vasıtasıyla zarar verebilmektedir. Bu durum genomun bütünlüğünde önemli bir rol oynamaktadır ve ROS üretiminin artması BCR/ABL aktivitesi ile ilişkilidir (Sattler, vd., 2000:6).

Normal ROS seviyeleri, hücrelerin çoğalma ve farklılaşmalarını düzenleyerek fizyolojik işlevlerini korumak ve immün tepkileri ve hücrel enflamasyonu kontrol etmek için gereklidir (Owusu-Ansah ve Banerjee, 2009:3). Normal fizyolojik koşullar altında, vücutta ROS oluşumu ve bozulması denge durumunda kalmaktadır. Normal seviyede ROS, HSC'lerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve mobilizasyonunu kontrol etmek için bir sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır. Ancak antioksidan sistemler arasındaki dengesizlik, ROS'un aşırı üretilmesine ve birikmesine neden olur. Yüksek ROS seviyelerinin ise HSC'ler

üzerinde toksik etkileri bulunmaktadır. HSC'lerde DNA hasarına neden olabilir, bu da anormal proliferasyon ve farklılaşma gibi işlev bozukluklarına yol açmaktadır (Y. F. Chen, vd., 2017:2)

Antioksidanlar Şekil 2.16.'de gösterildiği gibi homeostatik ayar noktasının altına düştüğünde hücre proliferasyonu kesintiye uğrayabilir. Artan ROS zararlı olabilir ve hücre ölümüne neden olabilir veya yaşlanmaya ve yaşa bağlı hastalıklara neden olabilir. ROS, protein, lipid ve DNA'ya zarar vererek hücre fonksiyon bozukluğuna ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Udensi ve Tchounwou, 2014:2).



Şekil 2.16. Dengesizliğin oksidatif strese yol açabileceği oksidan ve antioksidan türleri

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

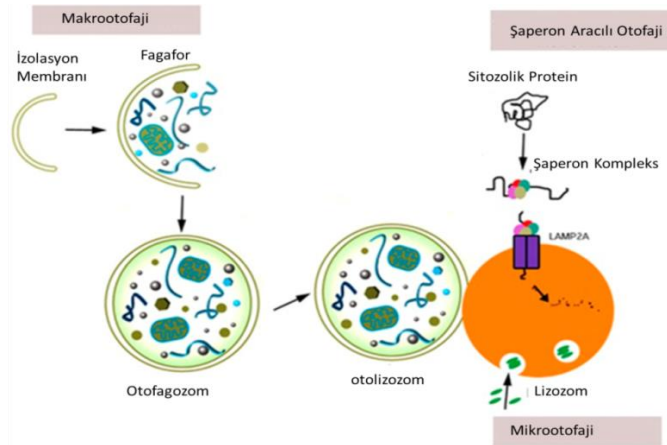
2.5. Otofaji

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). Otofaji süreci başlangıçta besin sınırlayıcı koşullar altında hücre sağkalımı mekanizması olarak tanımlanmıştır. Spesifik olarak, otofajik katabolik aktivite, hücrelerin besin yokluğunda yeterli enerji seviyelerini geri kazanmasını sağlamakta ve sonuç olarak canlılığı arttırmaktadır. Otofajinin bu özelliği, enerji için alternatif bir hücre kaynak olarak normal metabolizmanın sürdürülmesini sağladığı için gelişimsel süreç içerisinde özellikle önemlidir (Eisenberg-Lerner ve Kimchi, 2009:1). Otofaji terimi, Yunan kökenli “oto” (kendi) ve “faji” (yemek için) kelimelerinden türetilmiştir ve kendi kendine sindirim anlamına gelir (Manuscript, 2010:2).

2.5.1. Otofaji Türleri

Otofajinin 3 ana çeşiti vardır;

- 1) Mikrootofaji: Doğrudan invajinasyon, çıkıntı veya lizozomal veya vakuolar membranın ayrılması yoluyla sitoplazmik malzemeler lizozom veya vakuole translokasyonla geçer (Y. Chen ve Klionsky, 2011:1).
- 2) Şaperon aracılı otofaji (CMA): Daha yüksek ökaryotlarda karakterize edilen, ancak mayada olmayan bir işlemdir. CMA'da bir şaperon proteini önce sitosolik hedef substratına daha sonra ise 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) Makrootofaji: Sitosolik çift membranlı vezikül, otofagosom oluşumu ile karakterizedir. Makrootofaji, otofajik sürecin ana tipidir ve diğer iki tipten farklıdır. Makrootofaji sırasında, sitoplazmik proteinler, organeller veya diğer materyaller, otofagosomlar oluşturmak üzere genişleyen ve yakın olan fagofoslarla 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).



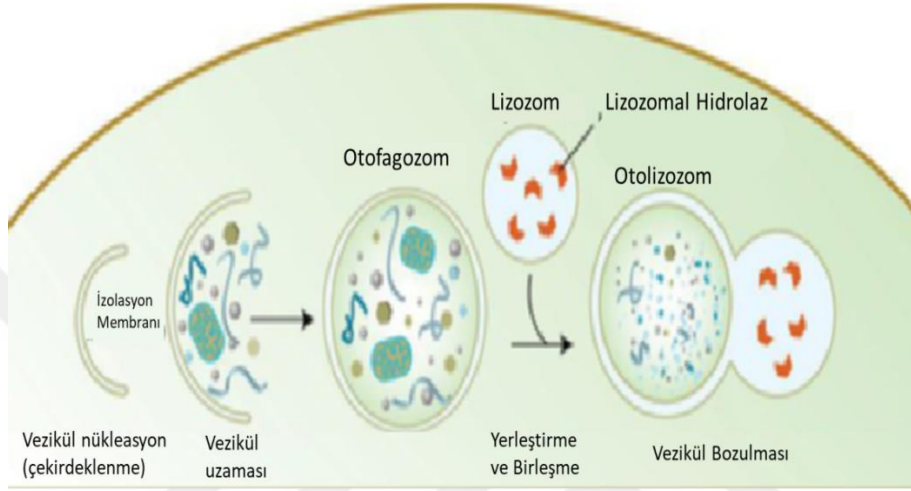
Şekil 2.17. Üç tip otofajinin şematik gösterimi

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

2.5.2. Otofajinin Mekanizması

Otofaji mekanizmalarında rol oynayan “otofaji ile bağlantılı proteinler” (Autophagy-related proteins) ya da kısaca Atg proteinleri olarak adlandırılan proteinler, mayada yapılan

çalışmalar sonucunda bulunmuştur. Günümüzde 30'dan fazla ATG geni tanımlanmıştır. Atg proteinlerinin bir kısmı ve çeşitli protein kompleksleri “otofajik kesecik” ya da bir başka deyişle “izolasyon membranı” ve otofagozom oluşumunda rol oynamaktadır. Hücrede otofagozomlar “otofaji oluşum merkezi” (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen ve memelilerde endoplazmik retikulum ile golgi yapılarının aralarına serpiştirilmiş olan yapılarda ortaya çıkmaktadırlar (Arslan, vd., 2011:2).



Şekil 2.18. Otofaji basamakları

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

Otofaji aşağıdaki temel adımlara ayrılabilir:

- 1) Başlatma (indüksiyon),
- 2) Vezikül nükleasyon (çekirdeklenme)
- 3) Vezikül uzaması
- 4) Lizozomla birleşme ve yıkım (Meléndez ve Levine, 2009:3; Nikoletopoulou, vd., 2015:2).

Başlatma / indüksiyon;

İlk kez mayada mantar oluşumuna karşı kullanılmak üzere geliştirilen rapamisin ilacının hedefi olan TOR proteini (target of rapamisin), hücrede protein sentezini ve hücrenin büyümesini tetikleyen serin-treonin kinaz üyesidir. Otofajinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir ve baskılanması durumunda otofajinin aktifleştiği bildirilmiştir. Hücrede besin varlığında, TOR aktifleşerek otofajiyi uyaran ATG1 (memelilerde ULK1/2), ATG13, ATG17 kompleksinden ULK1/2-ATG13'ü fosforile edilerek kompleksin bozulmasına neden olur ve bu sayede otofaji inhibe edilir. Besin açlığında ise TOR engellenir, otofajiyi uyaran kompleks bozulmaz. 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).

Vezikül nükleasyon (çekirdeklenme);

Memeli hücrelerinde 3 sınıf PI3K vardır; sınıf I PI3K otofajinin inhibitörüdür, sınıf II PI3K otofaji ile ilişkili değildir, sınıf III PI3K (Fosfatidilinositol-3-kinaz) otofajinin aktivatörüdür ve membran oluşumunu başlatır (Y. Chen ve Klionsky, 2011:5; Yang, vd., 2005:5). Bir fosfatidilinositol 3-kinaz kompleksinin aktivasyonu, otofaji sırasında vezikül çekirdeklenmesinde önemli bir adımdır. Aktiflenen ULK bileşenleri otofagozomun oluşması için sınıf III PI3K bileşenlerini aktifleştirir. Sınıf III PI3K kompleksi, beclin 1 (BECN1), Vps34 (PIK3C3) ve Vps15 genlerinden oluşur. fosfatidilinositol 3-kinaz kompleksinin aktivasyonu ile Atg proteinlerinin mayada fagofhore toplanma bölgesine (PAS) veya memelilerde PAS eşdeğerine alınmasıyla çekirdeklenme başlar (Y. Chen ve Klionsky, 2011:5).

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. Atg12'ye bağlanmış Atg5, Atg16 ile de birleşerek izolasyon membranının dış yüzeyine bağlanır. İkinci übikuitin benzeri konjugasyon sisteminde ise, Atg8 (Memelilerde MAP-LC3 ya da kısaca LC3 olarak adlandırılmaktadır.) proteini, bir fosfatidiletanolamin (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).

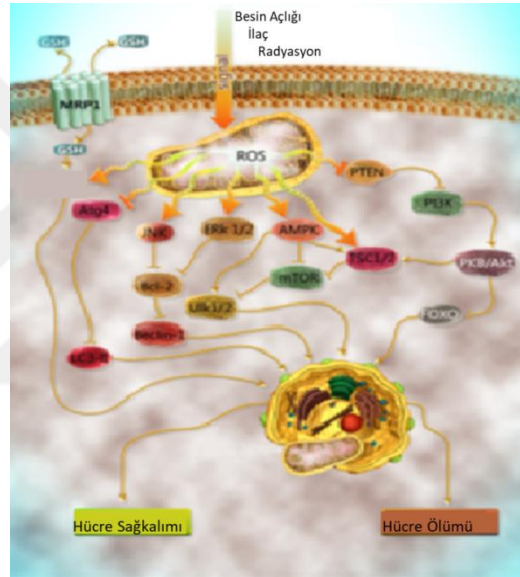
Lizozomla birleşme ve yıkım;

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). Otofagozom 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).

2.5.3. Otofajinin Düzenlenmesinde ROS'un Rolü

Reaktif oksijen türleri (ROS) 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 ROS kaynaklı olarak hücrelere ve dokulara verilen hasarı engeller (Y. F. Chen, vd., 2017:1).



Şekil 2.19. Reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından otofajinin düzenlenmesi

Kaynak: (Y. F. Chen, vd., 2017:5'ten değiştirilerek alınmıştır.)

ROS esas olarak mitokondride üretilir. Besin açlığı, ilaçlar ve radyasyonun neden olduğu artan ROS üretimi, AMPK-mTOR ve PI3K-Akt mTOR yolları gibi çeşitli sinyal yollarından otofajiyi düzenler. Ek olarak, artan ROS üretimi, GSH'nin MRP1 yoluyla çevreye salınması yoluyla hücrelerde redoks dengesizliğine yol açar, bu da otofajiye neden olur (Y. F. Chen, vd., 2017:7).

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 H₂O₂ tarafından önleyici oksidasyonu sayesinde gerçekleşir. Daha yavaş, daha dolaylı bir şekilde oksidatif stres, Beclin 1 ve LC3'ün

transkripsiyonunu da düzenler. Birlikte, bu koruyucu, otofajik etkiler ROS'taki ince değişikliklerle elde edilir. 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 METOTLAR

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.1. Laboratuvarda kullanılan cihazlar

Buz Makinesi	(Hoshizaki - FM-80KE)
Buzdolabı (+4 °C)	Regal
Buzdolabı (-20 °C)	Uğur
Buzdolabı (-80 °C)	Panasonic
CO₂'li İnkübatör	Memmert
Dikey Elektroforez Sistemi	Cleaver
Distile Su Cihazı	Mes
Etüv	Jeio Tech-IB-E
Hassas Terazi	Ohaus
İnvert Mikroskop	Nikon Eclipse TS100-F
Jel Görüntüleme Sistemi	Syngene - G-box
Laminar Flow	Scanlaf - Mars Safety Classe 2
Mikroplaka Okuyucu	Thermo Scientific - Multiscan Go
Neubauer Tip Thoma Lam	Marienfeld Superior
Nanodrop	BioSpec-nano
Otoklav	Nüve Steamart - OT 90L
pH Metre	İnolab - PH 7110
Pipet Seti	Nichiryo/Thermo Scientific
Rotatör	Biosan - Multi Bio RS24
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	Thermo Scientific - Micro CL 21R
Santrifüj Cihazı	Nüve - NF 800
Su Banyosu	Nüve- NF 800
Vorteks	Jeio Tech, Lab Companion
Western Transfer Sistemi	HOEFER
Yatay Elektroforez Sistemi	Cleaver

3.1.2. Sarf Malzemeler

Tablo 3.2. Laboratuvarda 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. Laboratuvarıda kullanılan kimyasallar

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

Tablo 3.3. Devam ediyor

KH₂PO₄	Merck Millipore
LC3 α/β antibody	Santa Cruz
Metanol	Sigma
MTT Reagent (Thiazolyl blue tetrazolium bromide)	Glentham Life Sciences
Na₂HPO₄	Merck Millipore
NaCl	Merck Millipore
Penisilin /Streptomisin	Gibco
PMSF	Cell Signaling Technology
Ponatinib	MCE
Ponceau Red	Merck Millipore
Protein Marker (11-250 kDa)	Invitrogen
Proteinaz K	Sigma
RIPA Tamponu	Cell Signaling Technology
RNase	MACHEREY-NAGEL
RPMI-1640 Besiyeri	Gibco
Sekonder Antikor	CST
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma
TEMED	Tokya Chemical Industry
Tripsin-EDTA	Sigma
Tris-Base	Sigma
Trypan Blue Solüsyonu (%0,4)	Amresco

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

1X PBS tamponu

Tablo 3.4.'te verilen kimyasallar 800 ml dH₂O içerisinde çözdürüldükten sonra pH 7,4'e ayarlanıp toplam 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
Na₂HPO₄	1,44 g
KH₂PO₄	0,24g

Hücre dondurma ortamı

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

Amonyum Asetat: 3M - 10 ml

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

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

0,0121 g Tris-Base tartılıp dH₂O’da çözdürülmüştür. HCl ile pH= 8’e getirilip hacmi 10 ml’ye tamamlanmıştır.

0,1 M EDTA: pH:8 – V=0,01 L

0,29 g EDTA dH₂O’da çözdürülmüştür.

%10 SDS

10 g SDS 800 ml distile su ile çözülecek hacmi 1000 ml’ye tamamlanmıştır.

%0,5’lik SDS

%10’luk SDS’ten seyreltmek için 500 µl alınıp dH₂O ile 10 ml’ye tamamlanmıştır.

%0,5’lik SDS hazırlamak için 0,5 g SDS tartılıp 100 ml dH₂O’ ile çözdürülmüştür.

Lyzis buffer

Tablo 3.5.’te belirtilen kimyasallar belirtilen miktarlarda karıştırılmıştır.

Tablo 3.5. Lyzis buffer içeriği

	10 ml için
10 mM Tris-HCl pH: 8	100 µl
0,1 M EDTA pH:8	2000 µl
%0,5'lik SDS	500 µl
dH₂O	7400 µl

TE buffer

Tablo 3.6'da belirtilen kimyasallar belirtilen miktarlarda karıştırılarak otoklavlanmıştır.

Tablo 3.6. TE buffer içeriği

1 M tris pH:8	2 ml
EDTA pH:8	0,4 ml
dH₂O	200 ml'ye tamamlanır

50X TAE

Tablo 3.7.'de belirtilen kimyasallar belirtilen miktarlarda karıştırılmıştır.

Tablo 3.7. 50X TAE içeriği

Tris-Base	242 g
Glasiyal Asetik Asit	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml
dH₂O	1000 ml'ye tamamlanır.

1X TAE

20 ml 50X TAE'den alınıp dH₂O 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 çözdürülmüştür.

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'luk)	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 dH₂O 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

Tris	30,25 g
Glisin	144 g
dH ₂ O	1000 ml'ye tamamlanır.

1X Towbin transfer tamponu

10X Towbin Transfer tamponundan 100 ml alınarak toplam hacmin %20si metanol olacak şekilde 200 ml metanol ve 700 ml dH₂O eklenmiştir.

%5 Süt

5 g Cell Signaling Technology marka 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

Tez kapsamında insan kronik myeloid lösemi hücre dizisi K562 hücrelerinin birinci nesil trozin kinaz inhibitörü imatinib ilacına karşı 1 μ M direnç kazandırılmış formu olan K562R hücre hattı kullanılmıştır. K562R hücre hattı 53 yaşında KML blastik kriz döneminde olan kadın hastanın plevral sıvısından elde edilmiştir. 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

Tez kapsamında insan kronik myeloid lösemi hücre dizisi K562S kullanılmıştır. K562S hücre hattı 53 yaşında 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. Gerekliğinde 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. Stok çözeltinin moralitesi yüksek olduğundan çok küçük miktarlarda sıvı çekmek zor olacağından dolayı deneylerde kullanmak üzere 1 mM konsantrasyondaki çözeltiden 1 µl alınıp 999 µl DMSO eklenerek 1 µM'lık çalışma stoğu hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler gerektiğinde kullanmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

Sıgla 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 CO₂ 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 CO₂'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 CO₂ 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

çözdürölüp yeniden 1000 rpm'de 5 dk santrifölj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Pelet üzerine T-25 flasklar için 4 ml, T-75 flasklar için 7 ml besiyeri ve K562R hücreleri için flastaki son molarite 1 µM olacak şekilde 1 mM imatinib'den T-25 flasklar için 4 µl, T-75 flasklar için 7 µl eklenerek 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde kültürleri gerçekleştirilmiştir.

Ancak K562R hücre hattının İmatinib'e maruz bırakıldığı süreçte, yapışma özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Önce süspansede olan hücreler tamamen toplanmış daha sonra yapışan hücreler Tripsin/EDTA ile inkübe edilerek hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Yüzeyden ayrılan hücreler süspansede hücrelerin toplandığı 15 ml'lik toplama tüpüne alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifölj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Pellet 1 ml PBS ile çözdürölüp yeniden 1000 rpm'de 5 dk santrifölj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Pelet üzerine T-25 flasklar için 4 ml, T-75 flasklar için 7 ml besiyeri ve total 1 µM imatinib eklenerek 37°C'de %5 CO₂'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. santrifölj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Pelet üzerine 1 ml freezing media (%90 FBS + %10 DMSO) eklenerek cryotüpe alınmış ve -80°C'ye kaldırılmıştır.

Dondurulmuş hücre hatlarının çözülmesi

Cryotüpteki hücreler -80°C'den alınarak elde ısıtılmış ve çözülmesi sağlanmıştır. 15 ml'lik toplama tüpüne 2 ml besiyeri üzerine alınan hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifölj edilmiş ve süpernatant 1 ml kalana kadar atılmıştır. Kalan 1 ml supernatant T-25 flaska alınmış ve üzerine 3 ml besiyeri eklenmiştir. Pelet üzerine 1 ml besiyeri eklenerek 3500 µl besiyeri eklenmiş iki adet T-25 flaska her ikisine de 500 µl olarak ekim yapılmıştır. Flaskların 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde kültürleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi (Tripın Mavisi Canlılık Testi)

Hücre canlılığının değerlendirilmesi için tripın mavisi canlılık testi yapılmıştır. Canlı hücreler membran bütünlüğüne sahip olmaları nedeniyle tripın mavisi boyasını hücre içine almazlar fakat ölü hücrelerin membran bütünlükleri bozulduğundan hücreler boyayı geçirir. Bu testte 6-well'de her kuyucuğa ekilmiş 200000 hücrenin imatinibin 0,01µM, 0,1µM, 0,5µM, 1 µM ve 10 µM dozlarında canlılığı gözlenmiştir. Çalışmalar ilaç dozu uygulanmamış kontrol grupları varlığında yürütülmüştür. Test aşamaları aşağıda belirtildiği gibidir.

1. 6-well'e her kuyucuğa 2×10^5 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 µl besiyeri ve 50 µl tripan blue boyası eklenerek pipetaj yapılmıştır.
4. Karışımdan 10 µl 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. Sitotoksite Çalışmaları

İmatinib, ponatinib ve sığla yağı etken maddelerinin hücreler üzerindeki sitotoksik konsantrasyonlarını saptamak amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT testi, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testidir. Mitokondrideki aktivitelere 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 mavimor 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 2×10^4 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 CO₂'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.

0,1 µM ponatinib çözeltisi dirençli K562R hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Hazırlanan ponatinib konsantrasyonları 0,010µM, 0,015µM, 0,020µM, 0,025µM, 0,030µM, 0,035µM, 0,040µM, 0,045µM, 0,050µM, 0,055µM, 0,060µM şeklindedir. Çalışmalar ilaç dozu uygulanmamış kontrol grupları varlığında yürütülmüştür.

3000 µg/ml sığla yağı çözeltisi dirençli K562R hücrelerine ve duyarlı K562S hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Hazırlanan sığla yağı konsantrasyonları 20µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml, 100µg/ml, 125µg/ml, 150µg/ml, 200µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml, 750µg/ml, 1000µg/ml şeklindedir. Çalışmalar ilaç dozu uygulanmamış kontrol grupları varlığında yürütülmüştür.

100 µM imatinib çözeltisi K562S hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Hazırlanan imatinib konsantrasyonları 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 1,5 µM, 2 µM, 5 µM, 7 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 30 µM şeklindedir. Çalışmalar ilaç dozu uygulanmamış kontrol grupları varlığında yürütülmüştür.

Kombine İlaç Uygulaması

Kombine uygulaması K562R hücre hattında sığla yağının 150µg/ml'de sabit tutulup ponatinibin IC₅₀ 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, 1/4,5, 1/4, 1/3,5, 1/3, 1/2,5, 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 edilir ve ROS indüklenmiştir.
2. İndükleyici bir ajan olmaksızın negatif kontrol hazırlanmıştır.
3. Pozitif kontrol için 496,8 μ L PBS içerisine 3,2 μ L %70 TBHP (Component B) ekleyerek 50 mM TBHP stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra ml başına 4 μ L 50 mM TBHP stok çözeltisinden eklenerek son konsantrasyon 200 μ M olacak şekilde ayarlanır ve 30 – 60 dk normal büyüme koşullarında inkübe edilmiştir.
4. Şişeyi açmadan önce H_2DCFDA 'nın (Component A) şişesi kısa süre santrifüj edilmiştir.
5. 10 μ M boya nihai çalışma konsantrasyonu sağlamak için H_2DCFDA 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 μ M H_2DCFDA 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 hücrel 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_{50} 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°C'de 5 dk santrifüj edilmiş ve supernatant atılmıştır.

3. Flasklar 2 defa 1,5 ml 1 defa 1 ml PBS ile yıkanmış, kazınmış 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 37⁰C'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. -20⁰C'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 1x10⁶ 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 37⁰C'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.

8. Hücreler 1x10⁶ hücre/ml'yi aşmayacak şekilde kültürlenmiştir.
9. Santrifüj ile hücreler toplanmıştır ve hücrelere test reaktifleri ile pozitif ve negatif kontroller uygulanmıştır.

10. 24 saat inkübasyondan sonra hücreler ortamdaki ayrılmış ve 2 kez 1X assay buffer ile yıkanmıştır.
11. Supernatant atılarak 100 µl mikroskopy dual detection reagent ile süspansiyon edilmiştir.
12. 30 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir.
13. Hücreler 1X assay buffer ile yıkanmıştır.
14. 100 µl 1X assay buffer ile süspansiyon edilmiştir.
15. 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 IC₅₀ değerlerinde konsantrasyonlarda K562R hücreleri için ponatinib, sıgla yağı ve kombine dozu K562S hücreleri için ise imatinib, sıgla yağı ve kombine dozu uygulanmış hücreler 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 çözündürülmüştür.
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.

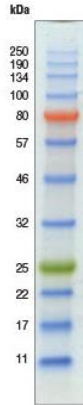
Protein örneklerinin hazırlanması

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 laemmlı 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. Protein konsantrasyonları belirlenen hücre lizatları jel kuyularına yüklendikten sonra elektrik akımı vasıtasıyla proteinler önce yükleme jelinden daha sonra ise ayrıştırıcı jelden geçerek sıralanırlar. 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 ortamdan 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.



Şekil 3.1. Kullanılan protein marker (CST)

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. Mambranlar %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.

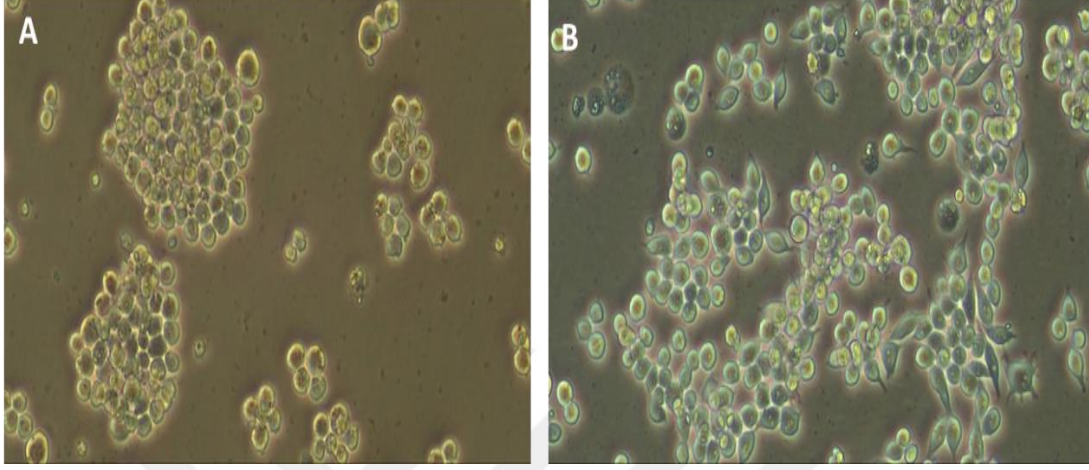
3.2.10. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler en az 3 tekrarın ortalamasıdır. Veriler Graph Pad Prism 9.0 ve Image J programı ile analiz edilmiştir. Karşılaştırmalarda bağımsız T-Testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Hattı Bulguları

Hücre kültürü çalışmalarında hücreler çoğaltılıp yedeklenmesi yapılmıştır. Şekil 4.1'de K562R ve K562S hücrelerin 20X objektif ile çekilmiş görüntüsü yer almaktadır.



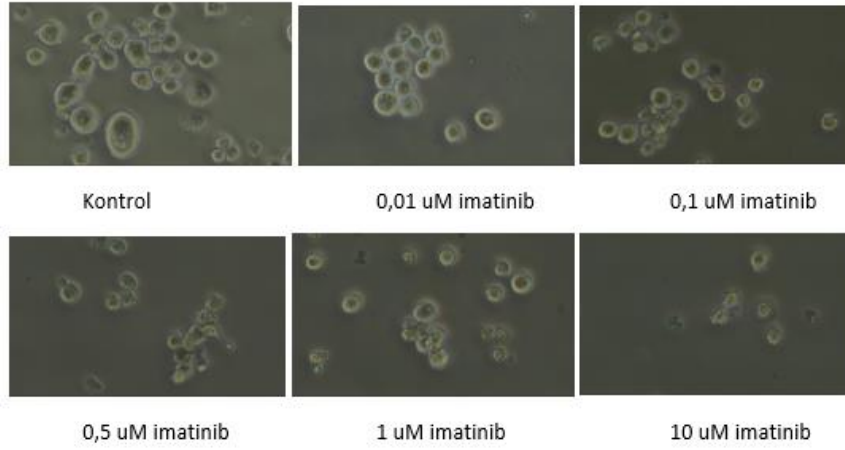
Şekil 4.1. Hücrelerin görüntüleri A) K562S hücrelerin görüntüsü. B) K562R hücrelerin görüntüsü

4.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi (Tripin Mavisi Canlılık Testi)

6-well'e her kuyucukta 1 ml RPMI besiyeri içerisinde 200000 hücre olacak şekilde, imatinibin 0,01 μ M, 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M ve 10 μ M dozları ile imatinib uygulanmamış kontrol grubu için ekim yapılmıştır. 48 saat inkübasyona bırakılan hücrelere tripan blue canlılık testi yapılmıştır. Her kuyucuktaki hücreler 1,5 ml toplama tüpüne toplanarak santrifüjlenmiş ve pellet üzerine 50 μ l besiyeri ile 50 μ l tripan blue karıştırılarak eklenmiştir. Pipetaj yapıldıktan sonra 10 μ l alınarak thoma lamında canlı ve ölü hücreler sayılmıştır. Boyayı içine almış hücreler ölü hücrelerdi ve mavi renkte görünüyordu, boyayı içine almayan beyaz ve parlak hücreler ise canlı hücrelerdi. Hücre canlılığı canlı hücre sayısının total hücre sayısına bölünmesiyle elde edilmiştir. Deney sonucunda hücre büyüme ortamına 1 μ M imatinib eklenmesine karar verilmiştir. Tablo 4.1'de canlı ve ölü hücre sayıları ile canlılık oranları gösterilmiştir. Şekil 4.2'de ise 48 saat inkübasyon sonucunda her kuyucuktaki hücrelerin görüntüsü gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Tripan Blue Canlılık Testi sonucunda hücre sayıları

	Canlı hücre sayısı	Ölü hücre sayısı	Total hücre sayısı	Canlılık (%)
Kontrol	2240000	130000	2370000	94
0,01 μ M imatinib	2400000	100000	2500000	96
0,1 μ M imatinib	480000	40000	520000	92
0,5 μ M imatinib	540000	60000	600000	88
1 μ M imatinib	410000	80000	490000	83
10 μ M imatinib	300000	80000	380000	78

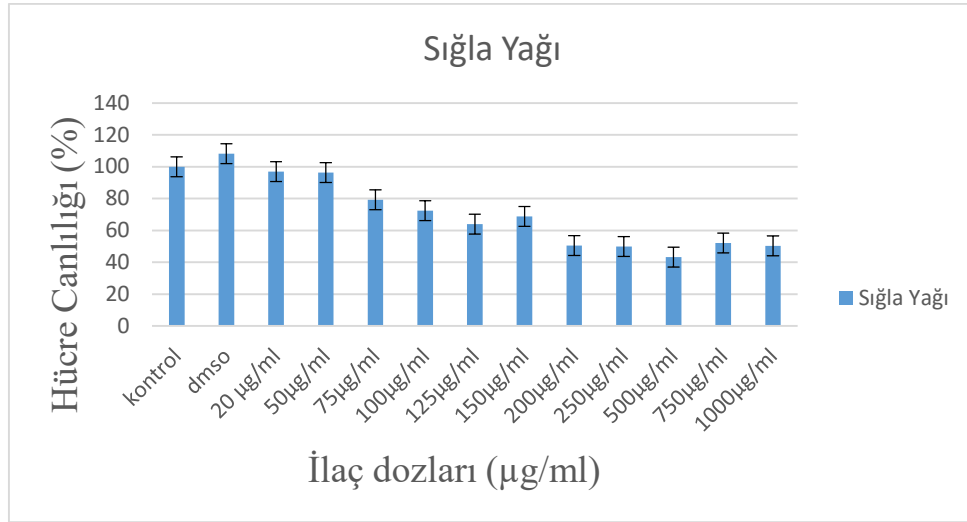


Şekil 4.2. İmatinibin farklı dozları ile 48 saat inkübasyona bırakılan hücrelerin mikroskop görüntüsü

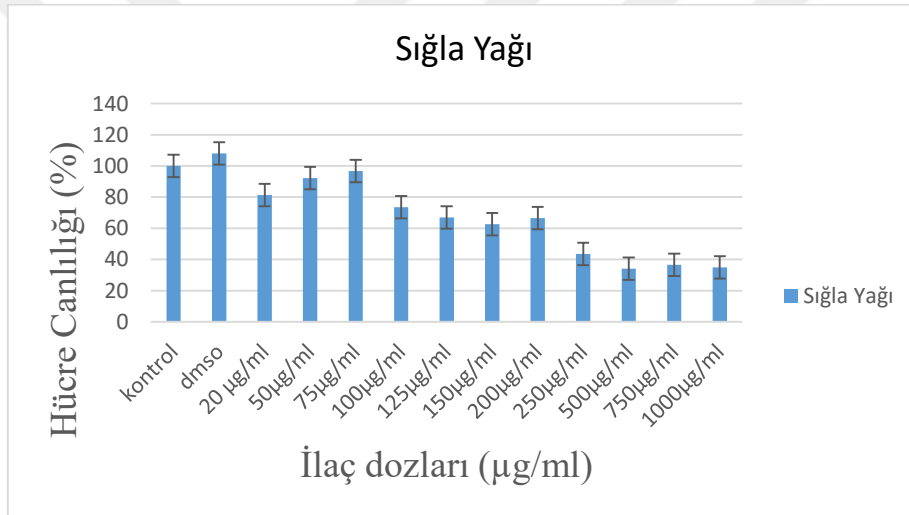
4.3. Sitotoksitenin Belirlenmesi

4.3.1. K562R Hücre Hattında Sığla Yağının Sitotoksitesinin Belirlenmesi

3000 μ g/ml sığla yağı çözültisi dirençli K562R hücrelerine 20 μ g/ml, 50 μ g/ml, 75 μ g/ml, 100 μ g/ml, 125 μ g/ml, 150 μ g/ml, 200 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml, 750 μ g/ml, 1000 μ g/ml dozlarında uygulanmıştır. Çalışmalar ilaç dozu uygulanmamış kontrol grupları ve DMSO uygulanmış negatif kontrol grupları varlığında yürütülmüştür. Büyüme ortamına imatinib eklendiğinde sığla yağı IC₅₀ değeri 24 saat inkübasyon sonucunda 250 μ g/ml olarak belirlenmiştir. Büyüme ortamına imatinib eklenmediğinde aynı dozlar denenmiş ve sığla yağı IC₅₀ değeri yine 250 μ g/ml olarak belirlenmiştir. İmatinib içeren büyüme ortamında sığla yağı IC₅₀ değeri Grafik 4.1’de, imatinib içermeyen büyüme ortamında sığla yağı IC₅₀ değeri ise Grafik 4.2’de gösterilmiştir.



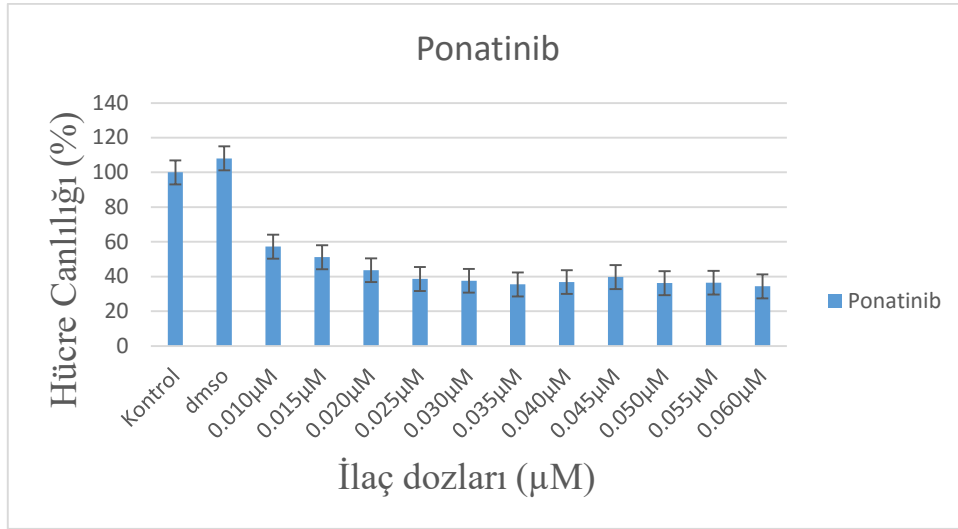
Grafik 4.1. K562R hücre hattında 1 μM imatinib eklenmiş büyüme ortamında sıgla yağı MTT sonuçları (IC₅₀ değeri 250 μg/ml)



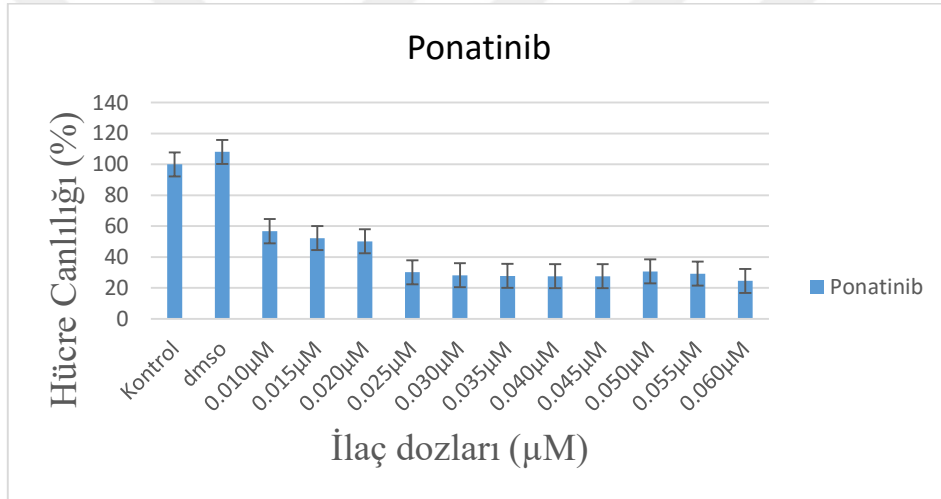
Grafik 4.2. K562R hücre hattında imatinib eklenmemiş büyüme ortamında sıgla yağı MTT sonuçları (IC₅₀ değeri 250 μg/ml)

4.3.2. K562R Hücre Hattında Ponatinibin Sitotoksitesinin Belirlenmesi

0,1 μM ponatinib çözeltisi dirençli K-562 hücrelerine 0,010μM, 0,015μM, 0,020μM, 0,025μM, 0,030μM, 0,035μM, 0,040μM, 0,045μM, 0,050μM, 0,055μM, 0,060μM dozlarında uygulanmıştır. Çalışmalar ilaç dozu uygulanmamış kontrol grupları varlığında yürütülmüştür. Büyüme ortamına imatinib eklendiğinde ponatinib IC₅₀ değeri 24 saat inkübasyon sonucunda 0,015 μM olarak belirlenmiştir. Büyüme ortamına imatinib eklenmediğinde aynı dozlar denenmiş ve ponatinib IC₅₀ değeri 0,020 μM olarak belirlenmiştir. İmatinib eklenmiş büyüme ortamında ponatinib IC₅₀ değeri Grafik 4.3'te, imatinib eklenmiş büyüme ortamında ponatinib IC₅₀ değeri ise Grafik 4.4'te gösterilmiştir.



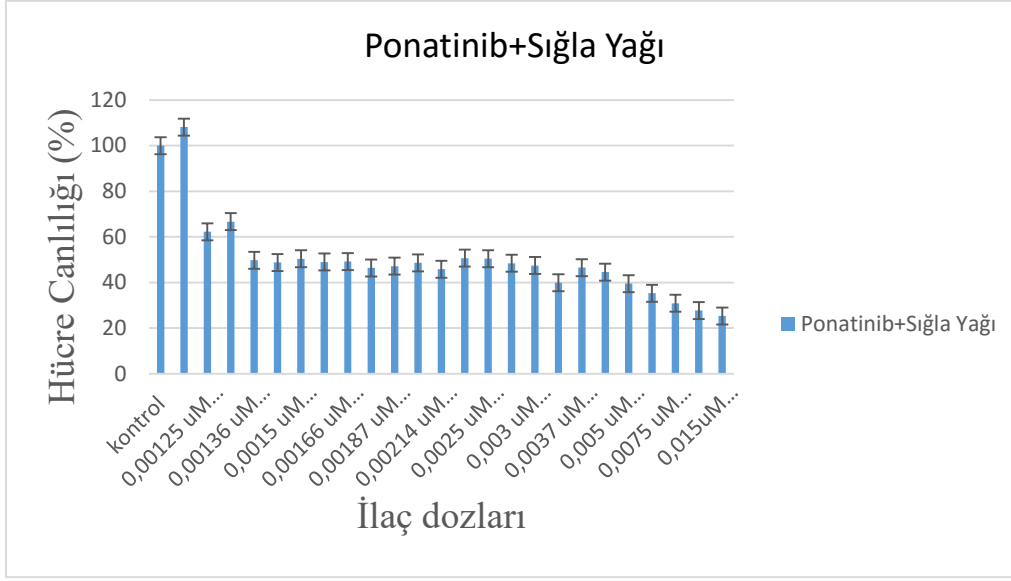
Grafik 4.3. 1 µM imatinib eklenmiş büyüme ortamında ponatinib MTT sonuçları (IC₅₀ değeri 0,015 µM)



Grafik 4.4. imatinib eklenmemiş büyüme ortamında ponatinib MTT sonuçları (IC₅₀ değeri 0,020 µM)

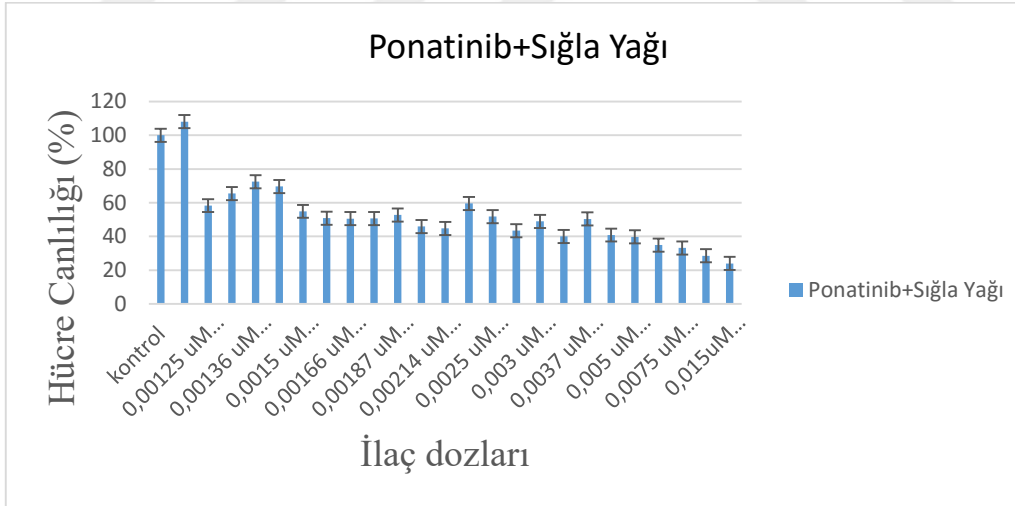
4.3.3. K562R Hücre Hattında Sıgla Yağı ve Ponatinib Kombinasyon Analizleri

İmatinib içeren büyüme ortamında sıgla yağı miktarını 150 µg/ml sabit tutup ponatinibin farklı dozlarını denediğimizde IC₅₀ değeri 0,0015 µM Ponatinib + 150 µg/ml sweetgum oil olarak bulunmuştur. İmatinib eklenmiş büyüme ortamında kombine uygulaması IC₅₀ değerleri Grafik 4.5'te gösterilmiştir.



Grafik 4.5. 1 µM imatinib eklenmiş büyüme ortamında ponatinib ve sığla yağı kombine MTT sonuçları (IC₅₀ değeri 0,0015 µM Ponatinib + 150 µg/ml sığla yağı)

İmatinib içermeyen büyüme ortamında da sweetgum oil miktarını 150 µg/ml sabit tutup ponatinibin farklı dozlarını denediğimizde ise IC₅₀ değeri 0,0037 µM Ponatinib + 150 µg/ml sığla yağı olarak belirlenmiştir. İmatinib içermeyen büyüme ortamında kombine uygulaması IC₅₀ değerleri ise grafik 4.6'da gösterilmiştir.



Grafik 4.6. İmatinib eklenmemiş büyüme ortamında ponatinib ve sığla yağı kombine MTT sonuçları (IC₅₀ değeri 0,0037 µM Ponatinib + 150 µg/ml sığla yağı)

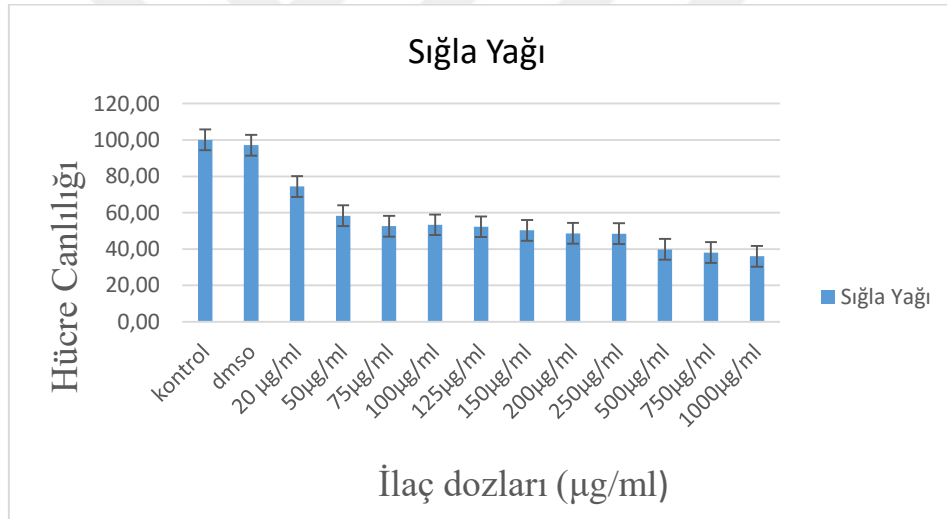
İmatinib uygulanmamış kültürde ve imatinib uygulanmış kültürde IC₅₀ değerlerinin farklı olması imatinibin de hücre hattı üzerinde etkili olduğunu ve üç ilacın birlikte etkileşime girebildiğini göstermektedir. Ponatinibin yan etkilerini en aza indirmek için imatinib bulunan ortamda 150 µg/ml sığla yağı kullanıldığında ponatinibin daha düşük dozunun etkili olduğu (0,0037 µM yerine 0,0015 µM) görülmüştür.

K562R hücrelerinde 1 μM İmatinib içeren büyüme ortamında, 250 $\mu\text{g/ml}$ sığla yağı ve 0,015 μM ponatinib optimum dozlar olarak belirlenmiş ve deneylerde bu dozlar kullanılmıştır. İmatinibin etkilerinin gösterilebilmesi amacıyla her iki kombine dozu da diğer deneylerde kullanılmıştır.

İlaç (ponatinib, sığla yağı ve kombine sığla yağı ve ponatinib) uygulamaları sonucunda hücrelerdeki morfolojik değişiklikleri izlemek amacıyla hücreler fotoğraflanmıştır.

4.3.4. K562S Hücre Hattında Sığla Yağının Sitotoksitesinin Belirlenmesi

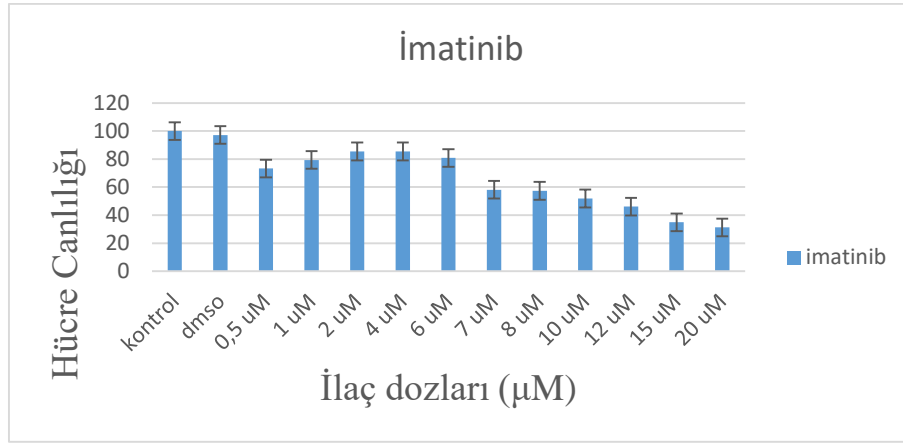
3000 $\mu\text{g/ml}$ sığla yağı çözeltisi K562S hücrelerine 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 750 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında uygulanmıştır. Çalışmalar ilaç dozu uygulanmamış kontrol grupları varlığında yürütülmüştür. Sığla yağı IC_{50} değeri 24 saat inkübasyon sonucunda 150 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Sığla yağı IC_{50} değeri Grafik 4.7’de gösterilmiştir.



Grafik 4.7. K562S hücre hattında sığla yağı MTT sonuçları (IC_{50} değeri 150 $\mu\text{g/ml}$)

4.3.5. K562S Hücre Hattında İmatinibin Sitotoksitesinin Belirlenmesi

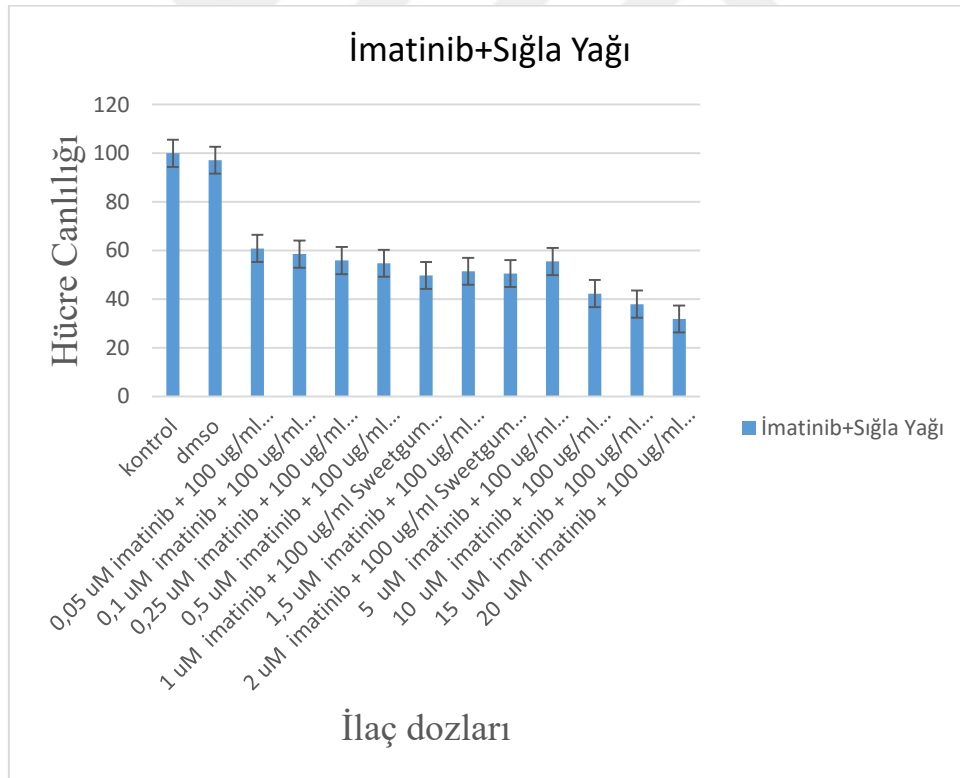
100 μM imatinib çözeltisi K562S hücrelerine 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 4 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 10 μM , 12 μM , 15 μM ve 20 μM dozlarında uygulanmıştır. Çalışmalar ilaç dozu uygulanmamış kontrol grupları varlığında yürütülmüştür. İmatinib IC_{50} değeri 24 saat inkübasyon sonucunda 10 μM olarak belirlenmiştir. İmatinib IC_{50} değeri Grafik 4.8’de gösterilmiştir.



Grafik 4.8. K562S hücre hattında imatinib MTT sonuçları (IC₅₀ değeri 10 µM)

4.3.6. K562S Hücre Hattında Sığıla Yağı ve İmatinib Kombinasyon Analizleri

Sığıla yağı miktarını 100 µg/ml sabit tutup imatinibin farklı dozlarını denendiğinde IC₅₀ değeri 2 µM imatinib + 100 µg/ml sığıla yağı olarak bulunmuştur. IC₅₀ değeri Grafik 4.9'da gösterilmiştir.



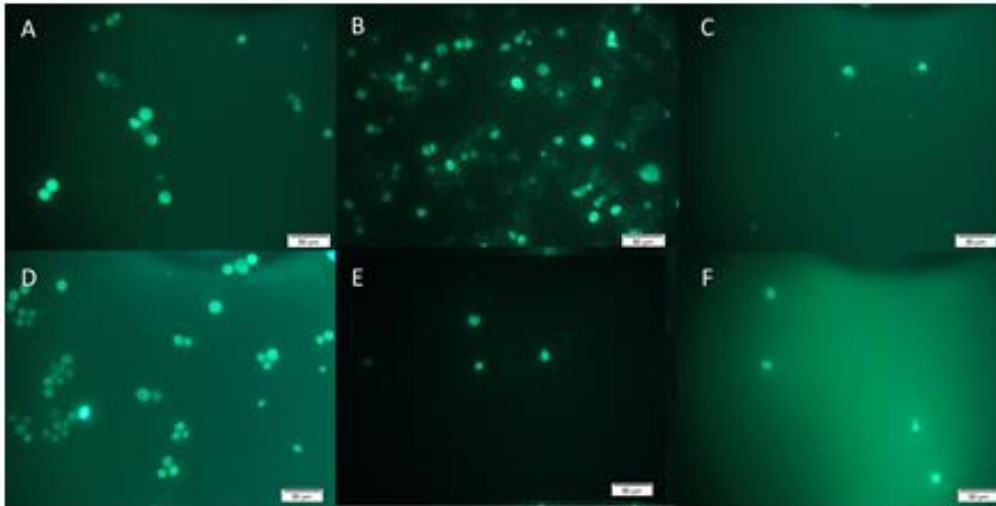
Grafik 4.9. K562S hücre hattında imatinib ve sığıla yağı kombine MTT sonuçları (IC₅₀ değeri 2 µM imatinib + 100 µg/ml sığıla yağı).

4.4. ROS Tespiti

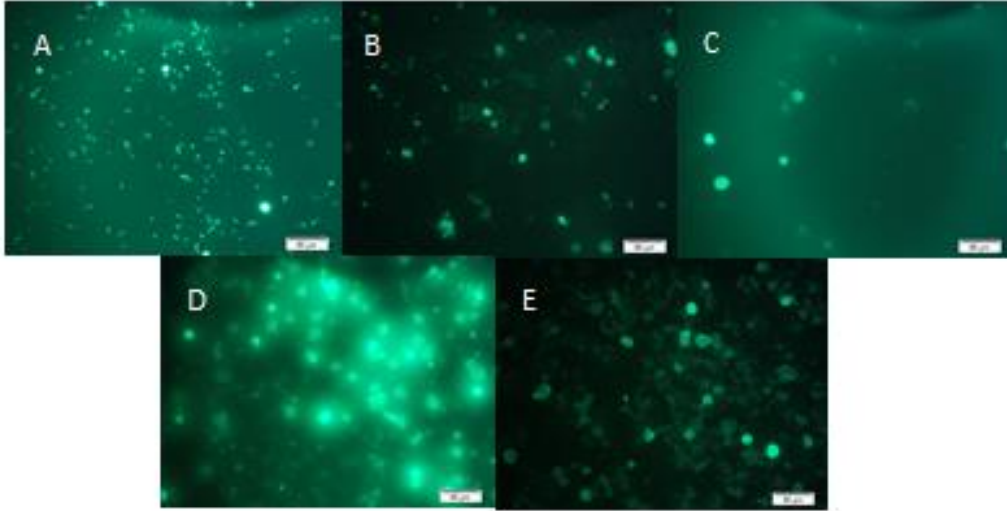
K562R ve K562S hücrelerine belirlenen dozlarda imatinib, ponatinib ve sığla yağı uygulandıktan 24 saat sonra boya uygulanarak ROS etkileri floresan mikroskop ile görüntülenmiştir. K562R ve K562S hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.3. ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Grafik 4.10'da oluşan ROS'un grafiği gösterilmiştir.

K562R hücrelerinde sığla yağı uygulanmış grupta oluşan ROS'un ponatinib uygulanmış gruba kıyasla kıyasla %28,8 oranında daha az olduğu görülmektedir. Kombine uygulamaları incelendiğinde ise sığla yağının tekli uygulamalarına göre ROS'un %67,56 oranında daha az olduğu görülmektedir.

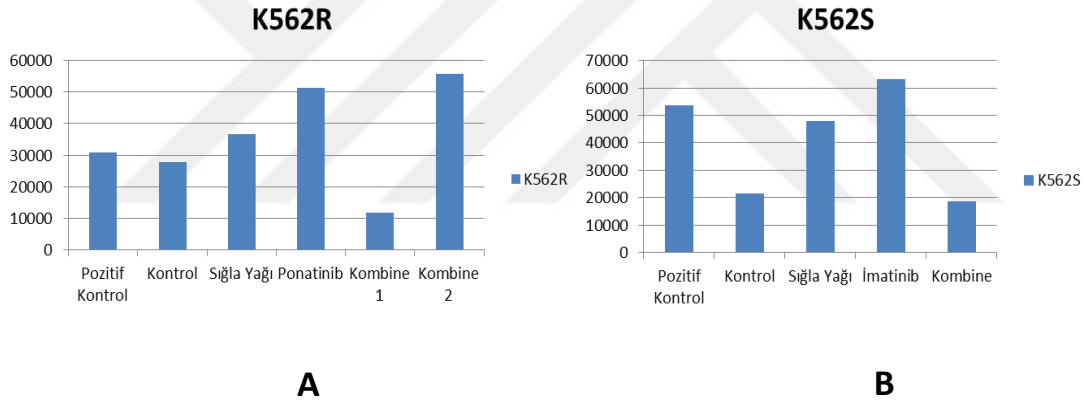
K562S hücrelerinde ise sığla yağı uygulanmış grupta oluşan ROS'un imatinib uygulanmış gruba kıyasla %23,8 oranında daha az olduğu görülmektedir. Kombine uygulamasında ise sığla yağının tekli uygulamasına göre ROS'un %60,9 oranında daha az olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3. K562R hücrelerinde oluşan ROS'un floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x)
A)Pozitif kontrol B)Kontrol C) Sığla Yağı D)Ponatinib E)0,0015 µM Ponatinib + 150 µg/ml Sığla Yağı F)0,0037 µM Ponatinib + 150 µg/ml sığla yağı



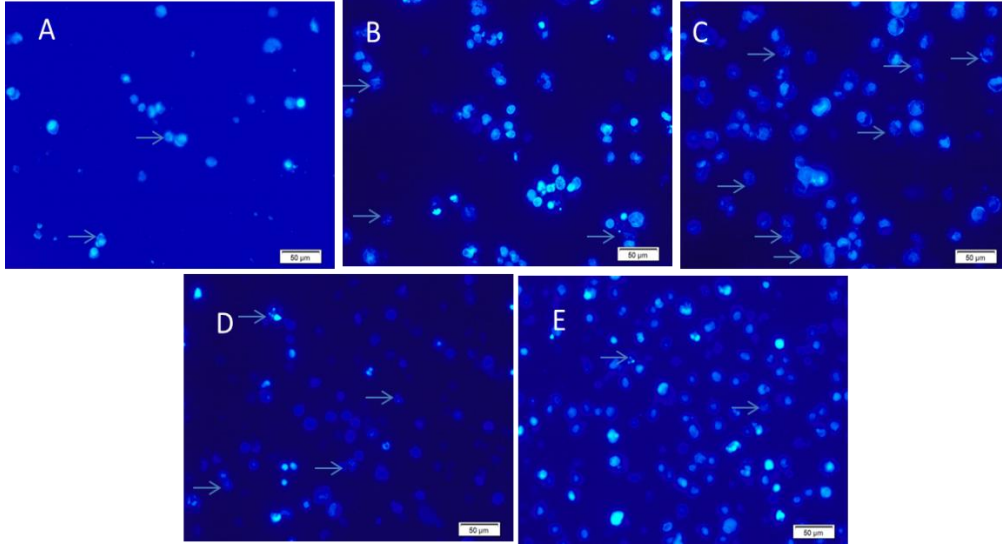
Şekil 4.4. K562S hücrelerinde oluşan ROS'un floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x) A)Pozitif kontrol B)Kontrol C) Sığıla Yağı D)İmatinib E)2 μ M imatinib + 100 μ g/ml Sığıla Yağı



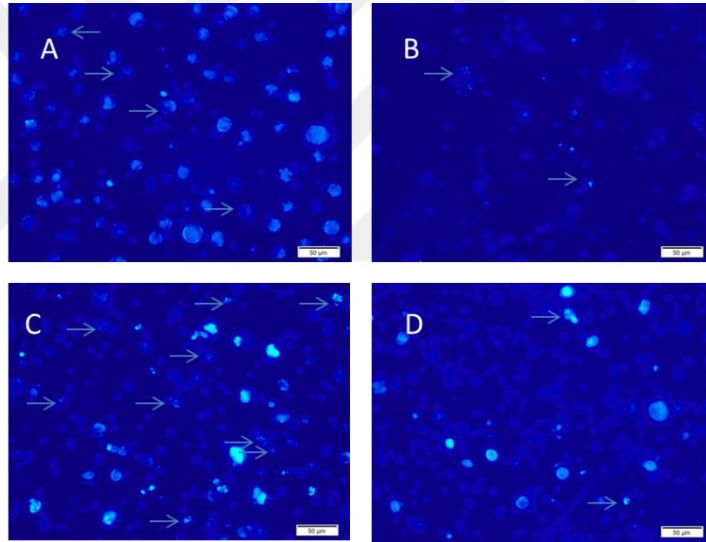
Grafik 4.10. Oluşan ROS'un Grafiği A) K562R hücrelerinde ROS B) K562S hücrelerinde ROS

4.5. DNA Hasarının Belirlenmesi

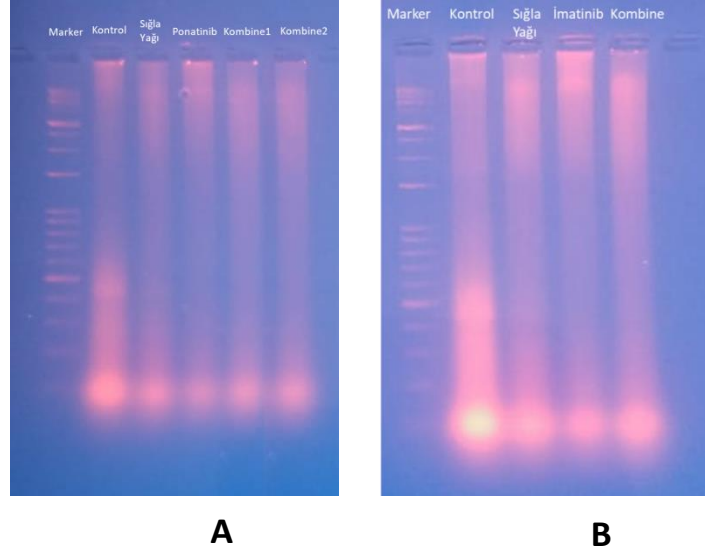
K562R ve K562S hücrelerine belirlenen dozlarda imatinib, ponatinib ve sığıla yağı uygulandıktan 24 saat sonra agaroz jel elektroforezi ile ve Hoecsht (33342) boyası uygulanarak floresan mikroskop ile DNA kırıkları görüntülenmiştir. K562R ve K562S hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Şekillerde gri oklar oluşan DNA kırıklarını göstermektedir. Ayrıca DNA kırıklarını görebilmek amacıyla DNA laddering deneyi yapılmıştır. Agaroz jel elektroforezine ait görüntüler Şekil 4.7'de gösterilmiştir. İmatinib ve ponatinib uygulamalarında DNA hasarının kontrol ve sığıla yağı gruplarına kıyasla arttığı görülmektedir.



Şekil 4.5. K562R hücrelerinde DNA kırıklarının floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x)
 A)Kontrol B) Sığla Yağı C)Ponatinib D)0,0015 μM Ponatinib + 150 $\mu\text{g/ml}$ Sığla Yağı oil
 E)0,0037 μM Ponatinib + 150 $\mu\text{g/ml}$ Sığla Yağı (Oklar DNA kırıklarını göstermektedir.)



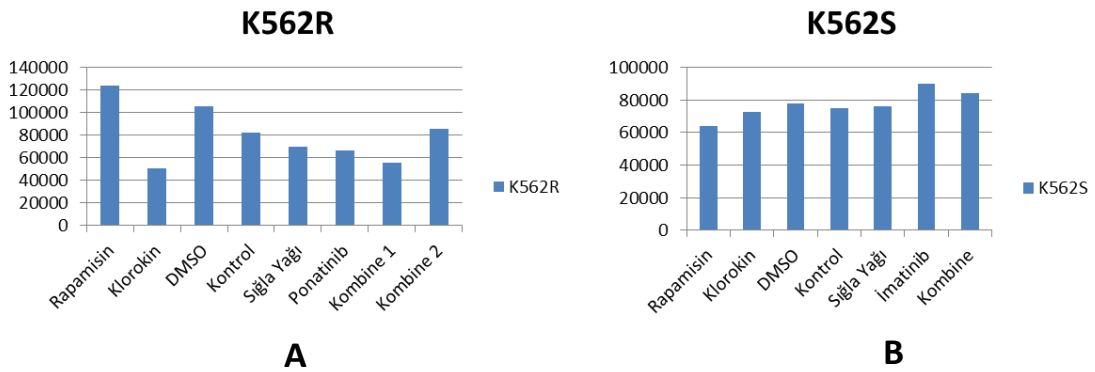
Şekil 4.6. K562S hücrelerinde DNA kırıklarının floresan mikroskop ile gösterilmesi (40x)
 A)Kontrol B) Sığla Yağı C)İmatinib D)2 μM İmatinib + 100 $\mu\text{g/ml}$ Sığla Yağı (Oklar DNA kırıklarını göstermektedir.)



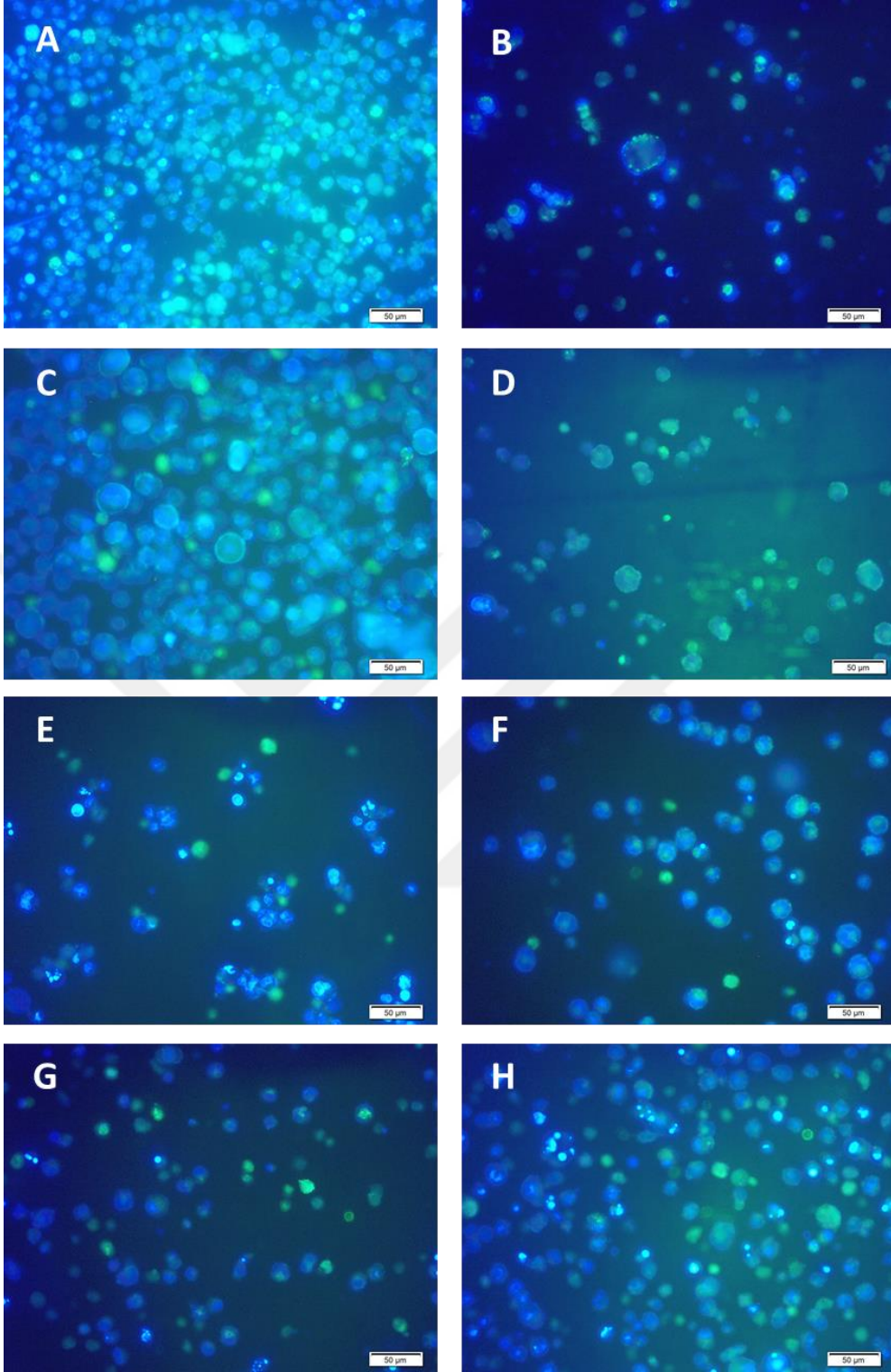
Şekil 4.7. Agaroz jel elektroforezi ile DNA kırıklarının gösterilmesi A) K562R hücreleri B) K562S hücreleri

4.6. Otofaji Belirlenmesi

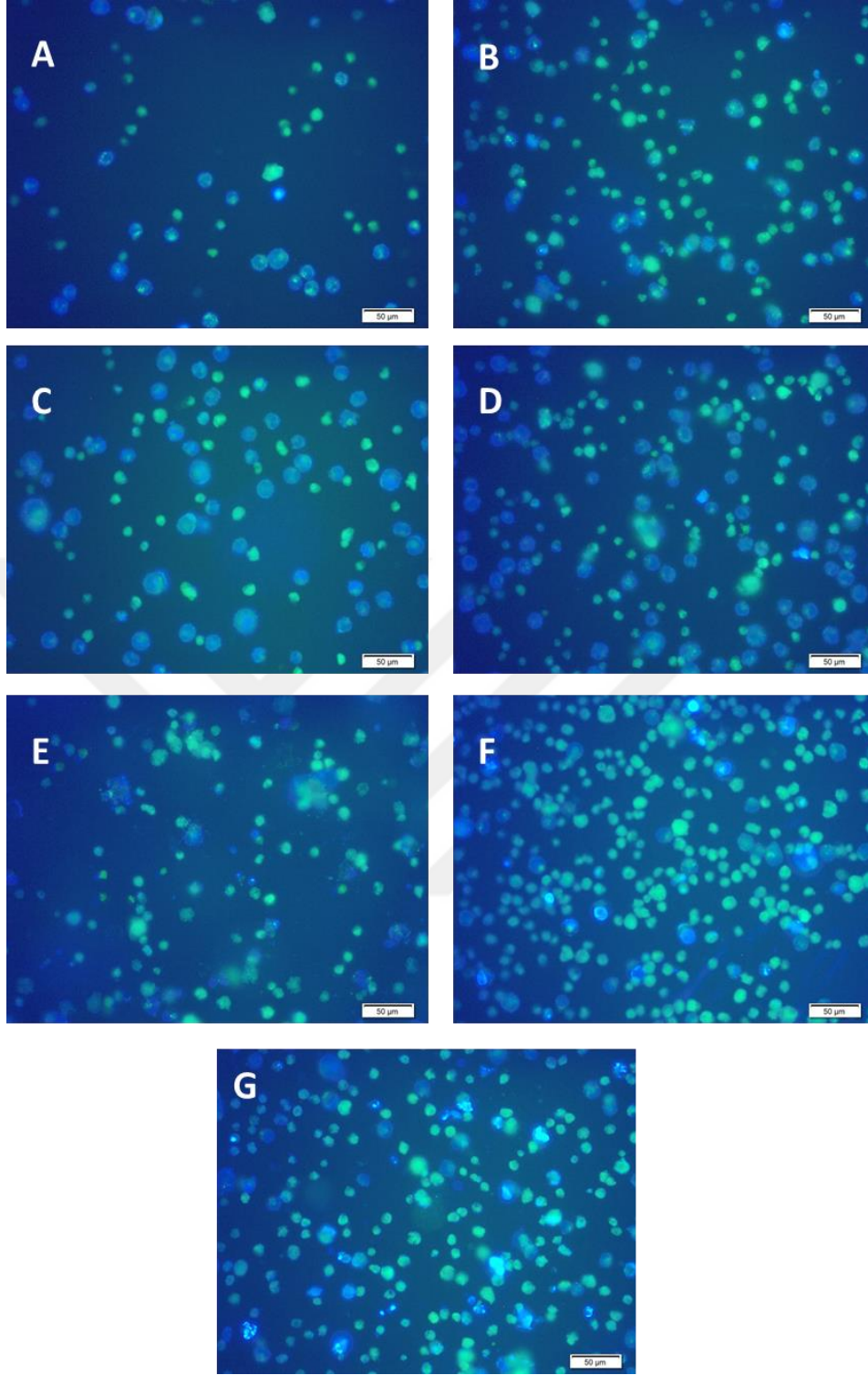
K562R ve K562S hücrelerinde otofajiyi saptamak amacıyla CYTO-ID otofaji saptama kiti kullanılmıştır. Hücreler belirlenen dozlarda ilaçlarla 24 saat inkübe edildikten sonra kit prosedürü uygulanmış ve floresan mikroskopta görüntüleri alınmıştır. Grafik 4.11’de otofajik aktivasyonun grafiği gösterilmiştir. K562R ve K562S hücrelerinde otofajik aktivasyonu gösteren floresan mikroskop görüntüleri ise Şekil 4.8. ve Şekil 4.9’de gösterilmiştir. K562R hücrelerinde sıgla yağının ponatinibe göre otofajik aktivasyonu artırdığı, K562S hücrelerinde ise imatinibe göre otofajik aktivasyonu azalttığı görülmektedir.



Grafik 4.11. Otofaji Grafiği A) K562R hücreleri B) K562S hücreleri



Şekil 4.8. 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



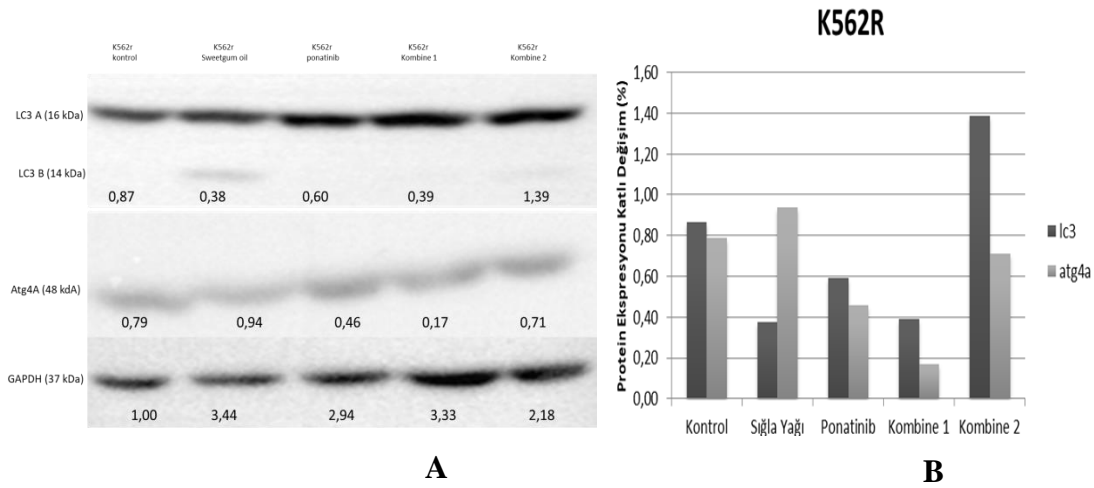
Şekil 4.9. 40X büyütme ile K562S hücrelerinde oluşan otofaji. A) Rapamisin B) Klorokin C) DMSO D) Kontrol E) Sığla Yağı F) İmatinib G) 2 µM İmatinib + 100 µg/ml Sığla Yağı

4.7. İmmunblotlama Metodu

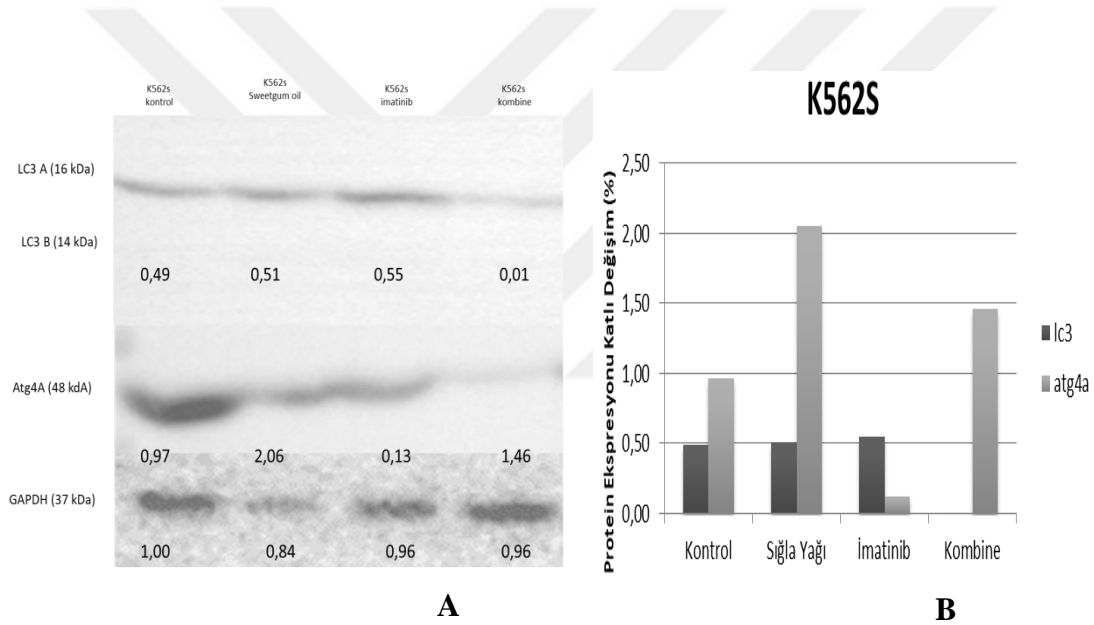
Sığla yağı, imatinib ve ponatinib ile indüklenen K562R ve K562S hücrelerinde, Atg4A ve LC3 I/II proteinlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi gösterilmek amacıyla western blot yöntemi uygulanmıştır. K562R ve K562S hücrelerinin western blot görüntüleri ve kat değişim grafikleri Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de gösterilmiştir.

K562R hücrelerinde LC3-I ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla sığla yağı uygulanan grupta azaldığı western blot deneyinde görülmektedir. Sitozolik LC3-I’e fosfatidetanolamin (PE) ilave edilerek LC3-II’ye dönüştürüldüğü bu durum otofajinin indüklendiği anlamına gelmektedir. ROS azaldığı için Atg4A ekspresyonunun da sığla yağı uygulanan grupta arttığı görülmektedir.

K562S hücrelerinde ise LC3-I ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla sığla yağı ve imatinib uygulamasıyla birlikte arttığı kombine uygulamasında ise azaldığı gözlenmiştir. Kombine uygulamasında Otofaji indüksiyonunun sağlandığı görülmektedir. K562S hücrelerinde de ROS azaldığı için Atg4A ekspresyonunun da sığla yağı uygulanan grupta arttığı görülmektedir.



Şekil 4.10. A) K562R hücrelerinde Atg4A, LC3 α/β ve GAPDH proteinlerine ait western blot görüntüleri B) K562R hücrelerinde Atg4A ve LC3 α/β proteinlerine ait katlı değişim grafiği



Şekil 4.11. A) K562S hücrelerinde Atg4A, LC3 α/β ve GAPDH proteinlerine ait western blot görüntüleri B) K562S hücrelerinde Atg4A ve LC3 α/β proteinlerine ait katlı değişim grafiği

5. TARTIŞMA

Philadelphia kromozomu, 9. Kromozomun uzun kolundaki ABL onkogeni ile 22. kromozomun uzun kolundaki BCR bölgesi arasındaki karşılıklı translokasyondan kaynaklanan BCR/ABL füzyon geninden üretilir. BCR/ABL füzyon geni, KML vakalarının %90'ından fazlasında görülmektedir (Frazer, vd., 2007:1; Udensi ve Tchounwou, 2014:7). K562R hücre hattı, blastik transformasyondaki bir hastanın plevral efüzyonundan lösemik hücrelerin kültürlenmesi yoluyla oluşturulmuştur (Assaf, vd.,2003:1). K562 hücreleri sınırsız çoğalma kabiliyetine sahiptir ancak farklılaşmaya devam edemezler (H. M. Huang, vd., 2004:1). K562R hücrelerinin bu çalışmada kullanılmasının sebebi imatinib direnci göstermesi ve oksidatif stres, sitotoksikite ve anti-kanser çalışmalarında önceden kullanılmış olmasıdır.

BCR/ABL füzyon genini ifade eden KML hücrelerinin, düzensiz mitokondriyal elektron taşıma zinciri nedeniyle yüksek düzeyde reaktif oksijen türleri (ROS) biriktirdiğini ve bunun da genomik kararsızlığa yol açarak imatinib direncine yol açtığı bildirilmiştir (Blasiak J., vd., 2015:1).

Hücre içi ROS'un sinyal iletiminde önemli bir rol oynamasının yanı sıra, aynı zamanda ROS üretimi hücrel antioksidan savunmasını aştığında hücre yapısında hasara neden olmaktadır. Antioksidan temizleyiciler ve antioksidan enzimler ROS'a karşı hücrel savunmalar arasında yer almaktadır (Wu, vd., 2015:1).

Liquidambar orientalis Mill (*Hamamelidaceae*)'den elde edilen Sweetgum Oil (SO) Türk halk hekimliğinde antiülserojenik olarak yüzyıllar boyunca kullanılmıştır (Gurbuz, vd., 2013). SO'nun antibakteriyel aktivitesi Sağdıç ve arkadaşlarının yaptığı in vitro tekniklerle bildirilmiştir (Tian, vd., 2013). Antioksidan aktivitesi ise 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. *Liquidambar orientalis*'in yaralı gövdesinden elde edilen ve "Sığla Yağı" adıyla yerel olarak isimlendirilen reçineli bir eksüdat olan Sweetgum Oil'in koruyucu bir özellikte olduğu ve antioksidan aktivitesi olduğu sonucuna varmışlardır (Suzek, vd., 2016:2). Literatürde yer alan bir çalışmada ratlarda sığla yağı ile yanık yarasında kullanılan gümüş sülfadiazin karşılaştırılmıştır ve sığla yağının yanık yara iyileşmesini hızlandırdığı ve önemli ölçüde olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir (Kumral B., vd., 2015:18).

Bu çalışmada kronik myeloid lösemi hastalarının tedavisinde birinci basamak tedavi olarak kullanılan imatinibe ileri safhalarda direnç geliştirmiş olan K562R hücre hattında ve

direnç göstermeyen K562S hücre hattında, kemoterapötik ajanların kullanımı nedeniyle oluşan reaktif oksijen türlerinin DNA üzerindeki etkileri üzerinde durulmuştur. Bunun yanında Y. F. Chen ve arkadaşları tarafından bildirilmiş olan hücresel homeostazı sürdürmek için ROS ve otofajinin koordine olarak çalıştığı bilgisinden yola çıkılarak hücre hatları üzerinde otofajik aktivite incelenmiştir.

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.

Sığla yağı ile ilk defa yapılan sitotoksite ve antioksidan aktivite çalışmalarına göre; HeLa (insan serviks adenokarsinomu), A-549 (insan alveolar adenokarsinomu), MCF-7 (insan göğüs adenokarsinomu), CaCo-2 (insan kolorektal adenokarsinomu), mPANC96 (insan pankreas adenokarsinomu), PC-3 (insan prostat adenokarsinomu), U87MG (insan glioblastom-astrocitom hücre hattı), normal hücre hattı olarak HEK293 (insan embriyonik böbrek hücreleri) ve Vero (Afrika yeşil maymun böbrek epitelyal hücreleri) hücre hatları üzerinde sığla yağının hekzan, diklorometan, metanol ve su ekstraktları ile sitotoksitesini değerlendirilmiş ve IC₅₀ değerleri 6.68–48.90 µg/ml arasında belirlenmiştir (Nalbantsoy, A., vd., 2016:3). Antioksidan aktivite, HL-60 hücrelerinde DCF üretimi ile tespit edilmiştir. Ekstraktlar, 19.01–39.77 µg/ml arasındaki IC₅₀ değerleri ile potansiyel antioksidan etki göstermiştir (Nalbantsoy, A., vd., 2016:4).

Birçok hücre hattı üzerinde çalışma yapılmış olmasına rağmen K562R ve K562S hücre hatları üzerinde sığla yağının sitotoksitesini ve anti tümör özelliklerini inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanılmamış olup bu çalışma ilk defa yapılmaktadır ve özgün niteliktedir. Önceki çalışmalarda IC₅₀ değerleri 6.68–48.90 µg/ml arasında belirlenmiştir, bu çalışmada ise Sığla yağının IC₅₀ değeri K562R hücrelerinde 250 µg/ml olarak, K562S hücrelerinde ise 150 µg/ml olarak belirlenmiştir. Diğer hücre hatları ile yapılan çalışmalardan daha yüksek dozların K562R ve K562S hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermesinin nedeninin hücre hatlarının farklı özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

K562R hücreleri imatinibe dirençli hücreler olduğundan sitotoksite deneyleri hem imatinib içeren besiyeri ile hem de imatinib içermeyen besiyeri ile çoğaltılmış hücrelerde denenmiştir. Sığla yağının IC₅₀ değeri her iki durumda da 250 µg/ml olarak belirlenmiştir. Ponatinib IC₅₀ değeri ise imatinib içeren büyüme ortamında 0,015 µM olarak, imatinib içermeyen büyüme ortamında ise 0,020 µM olarak belirlenmiştir.

Kombine uygulamalarında sitotoksosite deneyleri sıgla yağının IC₅₀ değerine en yakın düşük doz olan 150 µg/ml dozunu sabit tutarak hem imatinib içeren büyüme ortamında hem de imatinib içermeyen büyüme ortamında gerçekleştirilmiştir. IC₅₀ değerlerinin farklı olması imatinibin de hücre hattı üzerinde etkili olduğunu ve üç ilacın birlikte etkileşime girebildiğini göstermektedir. İmatinibin hücreler üzerinde göstermiş olduğu sitotoksik etkisinden dolayı ponatinibin daha düşük dozunun yeterli olduğu düşünülmektedir. Ponatinibin yan etkilerini en aza indirebilmek için imatinib bulunan ortamda 150 µg/ml sıgla yağı kullanıldığında ponatinibin daha düşük dozunun etkili olduğu (0,0037 µM yerine 0,0015 µM) görülmüştür ve ilerideki deneylerde kullanmak için düşük dozda ponatinib ve imatinib içeren grup kullanılmıştır ve bu grup kombine 1 olarak adlandırılmıştır. Deneylerde imatinibin etkisini de görebilmek amacıyla diğer kombine dozu da uygulanmıştır ve kombine 2 olarak adlandırılmıştır. MTT deneyinde olduğu gibi diğer deneylerde de büyüme ortamına eklenen imatinibin K562R üzerinde farklı etkileri gözlenmiştir.

K562S hücrelerinde ise sıgla yağının IC₅₀ değeri 150 µg/ml olarak, imatinib IC₅₀ değeri ise 10 µM olarak belirlenmiştir. Sıgla yağı miktarını 100 µg/ml sabit tutup imatinibin farklı dozlarını denendiğinde IC₅₀ değeri 2 µM imatinib + 100 µg/ml sıgla yağı olarak bulunmuştur. Sıgla yağı ile imatinibin kombine uygulamasında da kemoterapötik ajanın daha düşük dozunun yeterli olduğu görülmüştür.

H2DCFDA, hücre içindeki reaktif oksijen türlerinin aktivitesini belirleyen bir boyadır. Kanser önleyici ilaçlar gibi birçok uyaran, hücrelerin ROS üretmesine neden olur. Oluşan ROS apoptozu indükler. DCFH-DA, hücre zarlarını geçebilir ve hücre içi esterazlar tarafından DCFH'ye bölünür ve böylece hücre içinde hapsolür. ROS DCFH'yi floresan DCF'ye (2,7-diklorofloresin) oksitleyerek floresansla sonuçlanır ve bu da apoptozun uyarıldığının göstergesidir (Rahman, vd., 2015:3). Bu çalışmada da H2DCFDA boyama ile reaktif oksijen türleri gözlenmiştir.

Grafik 4.10. dikkatli incelendiğinde sıgla 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 sıgla yağının tekli uygulamalarına göre K562R hücrelerinde %67,56 oranında, K562S hücrelerinde ise %60,9 oranında azaldığını görmekteyiz. Bu durumda sıgla yağının K562R ve K562S hücre hatları üzerinde tirozin kinaz inhibitörleri ile kombine uygulamasının ROS üzerine daha olumlu etkileri olduğunu söyleyebiliriz.

BCR/ABL, KML ilerlemesi ile artan ve BCR/ABL kendi kendine mutagenезini indükleyen reaktif oksijen türlerinin üretimini uyarmaktadır. İmatinib ve diğer tirozin kinaz inhibitörlerinin KML tedavisine dahil edilmesi, tedavi sonucunu radikal bir şekilde iyileştirmiştir ancak TKİ'lara direnç, ortaya çıkan bir sorun haline gelmiştir. TKİ direnci, TKİ'ye duyarlı hücelere göre daha yüksek ROS üretimi ile ilişkilendirilebilmektedir (Antoszevska-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.

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

Sıgla yağının antioksidan özelliğinden faydalanmak isterken bir de sıgla yağının da aynı zamanda oksidan özellik göstermesi göz ardı edilemezdi. Bu nedenle bu çalışmada sıgla yağının hücreler üzerinde oluşturduğu etkiler imatinib ve ponatinib ilaçlarının etkileriyle karşılaştırılmıştır. Nitekim sıgla yağının da imatinib ve ponatinib gibi ROS oluşumuna katkı sağladığı ve DNA hasarına neden olabileceği sonucu elde edilmiştir.

ROS, DNA hasarının nedenlerinden biri olarak bilinmektedir. İyonlaştırıcı Radyasyon (IR), çift iplik kırıklarını DNA'nın şeker omurgasına hücrelerde üretilen serbest radikaller yoluyla indükler. Srinivas ve arkadaşları ROS'un nükleosit bazlarını oksitleyerek DNA hasarını doğrudan indüklediğini bildirmişlerdir. ROS birikiminin ayrıca mitokondriyal DNA lezyonlarını, iplik kırılmalarını ve mitokondriyal DNA'nın bozulmasını indüklediğini de yaptıkları çalışmada göstermişlerdir (Srinivas, vd., 2019:2).

Bu çalışmada ROS'un neden olduğu DNA kırıklarını ve apoptozu göstermek amacıyla Hoecsht (33342) boyama ve DNA laddering deneyi yapılmıştır. Bu doğrultuda K562R hücre hattında ponatinib uygulanmış hücrelerde DNA kırıklarının sıgla yağı uygulanmış hücelere kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır. Yine K562S hücre hattında da sıgla yağı uygulanmış grupta ilaç uygulanmış diğer gruba (imatinib uygulanmış) göre daha az DNA kırıkları gözlenmiştir. Bu sonuçlarımız ROS ile DNA hasarı arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır.

Ayrıca ROS Atg4A'nın katalitik bölgesindeki sistein aminoasitlerini okside ederek Atg4A'yı inaktif yapar. Sıgla yağının antioksidan özelliği sayesinde ROS oluşumunun önüne geçmesine bağlı olarak sıgla yağı uygulanmış hücrelerde Atg4A ekspresyonunun daha fazla olduğu ve ROS'un fazla olduğu diğer gruplarda ise Atg4A ekspresyonunun azaldığı görülmektedir.

K562R hücrelerinde kombine 2 olarak adlandırılan 150 µg/ml sıgla yağı ile 0,0037 µM ponatinibin imatinib içermeyen büyüme ortamında uygulanmasıyla Atg4A ekspresyonunun diğer kombine uygulamaya göre daha fazla arttığı görülmektedir. ROS grafiğini incelediğimizde ROS oluşumuna bağlı olarak kombine 2'de Atg4A ekspresyonunun daha az olması beklenirken daha fazla gözlenmesinin birden fazla nedeni olabilir. Bunlardan bazıları şöyledir: Kombine 1'de imatinib içeren büyüme ortamı ve kombine 2'de ise imatinib içermeyen büyüme ortamı kullanılması bu farkın oluşmasına neden oluyor olabilir. Diğer yandan ponatinibin dozunun (kombine 1'de 0,0015 µM ponatinib kombine 2'de 0,0037 µM ponatinib) proteinlerin ekspresyon seviyelerine farklı etkileri olabilir. Ayrıca düşük seviyede üretilmiş olan ROS da, proteinlerin sistein gruplarını okside edebilir ancak bunu tersinir olarak gerçekleştirir. Antioksidan sistemler oksidatif modifikasyonun tersine çevrilmesinde etkili olur.

K562S hücrelerinde ise yine 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.

DNA'ya zarar veren ajanlar, mikrotübül hedefli ilaçlar, antimetabolitler, ölüm reseptör agonistleri, hormonal ajanlar, antianjiyojenik ajanlar, proteazom inhibitörleri, histon deasetilaz inhibitörleri ve kinaz inhibitörleri gibi çeşitli antikanser ilaç sınıflarının hepsinin otofajiyi etkilediği gösterilmiştir (Thorburn A., vd., 2014:2).

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).

Bu çalışmada otofaji aktivasyonu floresan mikroskop ile gözlenmiştir Grafik 4.11.'de hücrelerdeki otofaji aktivasyonu gösterilmiştir. ROS oluşumunu gösteren Grafik 4.10. ile Grafik 4.11. birlikte yorumlandığında K562R hücrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla sıgla yağının ROS'u artırırken otofaji aktivasyonunda ise azalmaya neden olduğu görülmektedir. Aynı durumun ponatinib için de geçerli olduğu grafiklerden anlaşılmaktadır. 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 fosfatidietanolamin (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). Bu nedenle bu çalışmada, otofajik aktiviteyi değerlendirmek amacıyla LC3 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.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sığla yağı ile yapılan çalışmalarda, sığla yağının K562R ve K562S hücreleri üzerinde antitümör etki gösterdiği ve hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Sığla yağı hücre çoğalmasını doza bağlı olarak azaltmıştır. Sığla 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.

Bu çalışmada K562R direçli hücre hattında ROS'un azalmasıyla otofajinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Homeostazın devam ettirilmesi için ROS ve otofajiyi içeren sinyal iletim yollarının, moleküler mekanizmaların aydınlatılması, kanser kemoterapisi için yeni hedefler sağlayabilir.

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
- Arslan, D., vd. (2011).** Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması, (4), 184–194.
- Assaf YA, vd. (2003).** CFTR in K562 leukemic cells. *Am J Physiol Cell Physiol.*; 285: 480-488
- 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>
- Blasiak, J., vd. (2015).** Reactive Oxygen Species and Mitochondrial DNA Damage and Repair in BCR-ABL Cells Resistant to Imatinib. *BioResearch open access*, 4(1), 334–342. <https://doi.org/10.1089/biores.2015.0022>
- Carr, R. M., vd. (2016).** HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- 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>
- Chuang, T. H., vd. (1995).** ABR and BCR are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22), 10282–10286. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10282>
- Clarkson B, vd. (2003).** Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia* 17: 1211–1262.
- Collins, S. J., & Groudine, M. T. (1983).** Rearrangement and amplification of c-abl sequences in the human chronic myelogenous leukemia cell line K-562. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(15), 4813–4817.
- 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>

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- 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.
- Du, W., vd. (2008).** Oxidative stress in fanconi anemia hematopoiesis and disease progression. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(11), 1909–1921. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2129>
- 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>
- Efe, A. (1986).** “*Liquidambar orientalis*’in morfolojik ve palinolojik özellikleri üzerine araştırmalar.” İst. Univ. Orm. Fak. Derg. Seri A, 37, 2.
- 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>
- Fanning, S., vd. (1996).** Effects of a selective inhibitor of the Ab1 tyrosine kinase on the growth of BCR-AB1 positive cells • © 199 6, 561–566.
- 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>
- Gribble, S. M., vd. (2000).** Cytogenetics of the chronic myeloid leukemia-derived cell line K562: karyotype clarification by multicolor fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization, and locus-specific fluorescence in situ hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics*, 118(1), 1–8.

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Gulcin I. (2006).** Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217:213–20.
- 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 β 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- κ 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>
- Hoshiko, T., vd. (2019).** Naked antisense double-stranded DNA oligonucleotide efficiently suppresses BCR-ABL positive leukemic cells. *Investigational New Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s10637-019-00862-9>
- Huang, H. M., vd. (2004).** Basic fibroblast growth factor antagonizes activin A-mediated growth inhibition and hemoglobin synthesis in K562 cells by activating ERK1/2 and deactivating p38 MAP kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(4), 1247–1252. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.083>
- Huang, W. S., vd. (2010).** Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoro methyl) phenyl} benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant. *J. Med. Chem.* 53, 4701–4719.
- 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
- Kantarjian, H. M., vd. (1988).** Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, 61(7), 1441–1446. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19880401\)61:7<1441::AID-CNCR2820610727>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19880401)61:7<1441::AID-CNCR2820610727>3.0.CO;2-C)
- 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>

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Kuhn, J. G. (1994).** Pharmacology and pharmacokinetics of paclitaxel. *Annals of Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1177/10600280940280s504>
- Kumar, P., vd. (2012)** Autophagy and Transporter-Based Multi-Drug Resistance, *Cells* 2012, 1, 558-575
- Kunnumakkara, A. B., vd. (2017).** Role of BCR-ABL Fusion Kinase in the Development of Leukemia. *Fusion Genes and Cancer*, 111–127. https://doi.org/10.1142/9789813200944_0005
- Kumral B, vd. (2015).** Sıçanlarda yanık yara iyileşmesinde topikal olarak uygulanan sığla yağının etkileri. NKUBAP.00.20.AR.14.10. 2015.
- Lozzio, C. B., & Lozzio, B. B. (1975).** Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45(3), 321–334.
- Manuscript, A. (2010).** As Novel Therapeutic Strategies in Cancer. *Autophagy*, 6(3), 322–329.
- Mauro MJ, & Deininger MW (2006).** Chronic myeloid leukemia in 2006: a perspective. *Haematologica* 91: 152–157
- 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.).
- Montagner, S., vd. (2014).** MicroRNAs in hematopoietic development. *BMC Immunology*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-15-14>
- 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.
- Mughal, T. I., & Goldman, J. M. (2008).** Chronic myeloid leukemia: A historical perspective. *Chronic Myeloproliferative Disorders*. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.418>
- Murat, A., & Kaya, Z. (2003).** Oriental sweet gum (*Liquidambar orientalis*). *EUFORGEN Technical Guidelines for Genetic Conservation and Use*, 1–6.

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Nalbantsoy, A., vd. (2016).** Antioxidant, cytotoxic and iNOS activity of Liquidambar orientalis Mill. resin extracts. *TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY-TURK BIYOKIMYA DERGISI*, vol.41, 198-205.
- Naumann, S., vd., (2001).** Complete karyotype characterization of the K562 cell line by combined application of G-banding, multiplex-fluorescence in situ hybridization, fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization. *Leukemia research*, 25(4), 313–322.
- 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>
- Obradovic, J. (2005).** NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- 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>
- Özcan, M., vd. (2005).** A study on inhibitory effect of sığla tree (liquidambar orientalis mill. Var. Orientalis) storax againsts several bacteria. *Phytother.Res.* **19**:549-551
- Pan, P., vd. (2019).** Systematic Review and Meta-Analysis of -New-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia. *Acta Haematologica*. <https://doi.org/10.1159/000501537>
- 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>
- Rahman, A., & Arshad, H., (2015).** Anticancer activity and apoptosis inducing effect of methanolic extract of Cordia dichotoma against human cancer cell line. *Bangladesh J Pharmacol.* 226026 India. 27-34.
- Sagdic O, vd. (2005).** Study on inhibitory effects of Sig̃la 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>

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Sattler, M., vd. (2000).** The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24273–24278. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002094200>
- 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>
- Siegel, R. L., vd. (2019).** Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Srinivas, ABD, vd. (2019).** ROS ve kanserde DNA hasarı tepkisi. *Redox biyolojisi*, 25, 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- 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>
- Thorburn A, vd. (2014).** Autophagy and cancer therapy. *Mol Pharmacol* 2014; 85(6): p. 830-838.
- Tian, J., vd. (2013).** Optimization of Porous SiO₂; Antireflective (AR) Coatings Used in Encapsulating Solar Modules. *Advanced Materials Research*, 739(November 2004), 94–100. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.739.94>
- Top, M., vd. (2007).** The health benefits of traditional chinese plant medicines: Weighing the scientific evidence. *Rural Industries Reserarch and Development corperation*. February, 06:128
- 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>
- Wagner, G., vd. (2012).** Leukaemia cutis - Epidemiologie, Klinik und Differenzialdiagnosen. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, 10(1), 27–37. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2011.07842.x>

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Wu, L., vd. (2015). A Novobiocin Derivative, XN4, Inhibits the Proliferation of Chronic Myeloid Leukemia Cells by Inducing Oxidative DNA Damage. *PloS one*, 10(4), e0123314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123314>

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>

Zhang, J., vd. (2018). Oxidative stress response induced by chemotherapy in leukemia treatment (Review). *Molecular and Clinical Oncology*, 391–399. <https://doi.org/10.3892/mco.2018.1549>

Zhou, B., vd. (2019). Comprehensive, integrated, and phased whole-genome analysis of the primary ENCODE cell line K562. *Genome research*, 29(3), 472–484.