T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

DİHİDROARTEMİSİNİN'İN İNSAN KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ HÜCRE SERİLERİNDE APOPTOZA ETKİLERİNİN İMMÜNOMOLEKÜLER DEĞERLENDİRİLMESİ

SANEM GÖKÇEN

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2019


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

DİHİDROARTEMİSİNİN'İN İNSAN KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ HÜCRE SERİLERİNDE APOPTOZA ETKİLERİNİN İMMÜNOMOLEKÜLER DEĞERLENDİRİLMESİ

Sanem GÖKÇEN

DOKTORA TEZİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEMMUZ 2019

Sanem GÖKÇEN tarafından hazırlanan "DİHİDROARTEMİSİNİN'İN İNSAN KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ HÜCRE SERİLERİNDE APOPTOZA ETKİLERİNİN İMMÜNOMOLEKÜLER DEĞERLENDİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof.Dr.E. Ümit BAĞRIAÇIK
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Başkan : Prof. Dr. Vedat BULUT
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye : Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI
Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye : Prof. Dr. A. Münci YAĞCI
İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye : Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN
Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Tez Savunma Tarihi: 10/07/2019

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sanem GÖKÇEN

10/07/2019



DİHİDROARTEMİSİNİN'İN İNSAN KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ HÜCRE SERİLERİNDE APOPTOZA ETKİLERİNİN İMMÜNOMOLEKÜLER DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Sanem GÖKÇEN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2019

ÖZET

Bu çalışmada, Dihidroartemisin'in (DHA) insan kronik lenfositik lösemi (KLL) hücre serileri üzerindeki apoptoza etkilerini hücre canlılığı, apoptoz, mRNA ve protein ifadelenme düzeyleri araştırılarak belirlemeyi amaçladık. Bu amaçla PGA-1, CII, MEC-1 insan KLL hücre serileri kullanıldı. Bu hücrelere öncelikle DHA ve KLL tedavisinde etkili bir pürin analoğu olan Fludurabin (FLU) ayrı ayrı ve birlikte olarak 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulandı. Bu süreler sonunda, XTT yöntemiyle belirlenen hücrelerin canlılık oranlarının doza ve zamana bağlı olarak azaldığı görüldü. Buradan elde edilen canlılık oranlarından, ilaçların KLL hücrelerinin çoğalmasında %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonları yani IC50 değerleri belirlendi. Hücrelere DHA ve FLU ayrı ayrı ve birlikte IC50 konsantrasyonlarının 24 saat boyunca uygulanmasından sonra apoptoza etkilerini belirlemek için hücreler, Annexin V-FITC ve PI ile boyanarak Akım Sitometri ile analizleri yapıldı. Sonuçlarımız DHA'nın tek başına ve FLU ile birlikte kullanılmasının doza bağlı olarak PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinde apoptotik cevaba neden olduğunu gösterdi. DHA'nın tek başına uygulanmasının, FLU'nun tek başına veya DHA ve FLU'nun birlikte uygulanmasına göre daha etkili olduğu görüldü. Apoptozun moleküler mekanizmalarını ortaya çıkarmak için kantitatif Real Time PCR ve Akım Sitometrik yöntemler kullanılarak TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 mRNA ve protein ifade düzeyleri analiz edildi. Tüm hücre serilerinde DHA'nın tek başına ve FLU ile birlikte uygulanmasından sonra Kaspaz-3'ün ifadelenmesinde artış oldu. DHA'nın tek başına ve FLU ile birlikte uygulanmasından sonra görülen apoptotik etkide Bcl-2 protein ailesi üyelerinin rol oynadığı ve genel olarak Bax'ın ifadelenmesinde artış olduğu bulundu. Buradan yola çıkarak PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinde görülen apoptotik cevapta intrinsik apoptotik yolağın aktif olduğu belirlendi. Elde edilen bu bulgulara göre DHA, kronik lenfositik lösemi için potansiyel kansere karşı bir ilaç olabilir ve bu yüzden, gelecekte yapılacak in vivo ve in vitro çalışmalarla DHA'nın moleküler etkilerinin tam olarak belirlenmesi KLL'nin tedavisi için yeni moleküler hedeflerin tanımlanmasına olanak sağlayacaktır.

Bilim Kodu	:	1039.2
Anahtar Kelimeler	:	Dihidroartemisinin, Kronik Lenfositik Lösemi, Apoptoz
Sayfa Adedi	:	136
Danışman	:	Prof.Dr.E.Ümit BAĞRIAÇIK

IMMUNOMOLECULAR EVALUATION OF DIHYDROARTEMISININ EFFECTS ON APOPTOSIS IN CHRONIC LYMPHOCYTİC LEUKEMİA CELL LINES

(Ph. D. Thesis)

Sanem GÖKÇEN

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

July 2019

ABSTRACT

In this study, we aimed to determine the effects of dihydroartemisinin (DHA) on human chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell lines by investigating the cell viability, apoptosis, mRNA and protein expression levels. PGA-1, CII and MEC-1 human CLL cell lines were used for this purpose. At first, the cells were treated separately and combined by DHA and Fludurabine (FLU), a purine analogue used in the treatment of CLL, during 24, 48 and 72 hours. At the end of these durations, it was seen that the cell viabilities determined by XTT method were decreased in a time and dose dependent manner. IC50 values, the concentrations of drugs to cause 50% reduction in proliferation of CLL cells, were determined from these cell viabilites. Following separate and combined treatment of IC50 concentrations of DHA and FLU to the cells during 24 hours, the cells were analyzed by flow cytometry to determine the effects on apopotis staining with AnnexinV-FITC and PI. Our results showed that treatment with DHA alone and in combination with FLU resulted in an apoptotic response in a dose dependent manner in PGA-1, CII ve MEC-1 cells. It was seen that DHA treatment alone was more effective than FLU treatment alone or combined treatment with DHA and FLU. mRNA and protein expression levels of TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax and Caspase-3 were analyzed to find out the molecular mechanisms of apoptosis by using quantitative Real-Time PCR and Flow Cytometric methods. Caspase-3 expression was increased in all cell lines after DHA treatment alone and in combination with FLU. It was found that members of Bcl-2 protein family were act on the apoptotic activity after DHA treatment alone and in combination with FLU, and Bax expression was generally increased. Starting from this point of view, it was determined that intrinsic pathway of apoptosis was active in the apoptotic response of PGA-1, CII ve MEC-1 cells. According to the obtained these findings, DHA might be a potential anti-cancer therapeutic for chronic chronic lymphocytic leukemia and therefore, determination of the exact molecular effects of DHA with future in vivo and in vitro studies would allow us to identify new molecular targets for the treatment of the CLL.

Science Code : 1039.2

Key Words : Dihydroartemisinin, Chronic Lymhocytic Leukemia, Apoptosis

Page Number : 136

Advisor : Prof.Dr.E.Ümit BAĞRIAÇIK

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım danışmanım Prof. Dr. E. Ümit BAĞRIAÇIK'a, değerli bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, maddi ve manevi her konuda bana destek olan, yanında çalışmaktan onur duyduğum, hiçbir zaman sabır, özveri ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen hocam Prof. Dr. A. Münci YAĞCI'ya, doktora eğitimim sırasında değerli katkılarından dolayı İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşegül Atak YÜCEL'e, Prof. Dr. Vedat BULUT'a ve bütün hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Handan KAYHAN'a, doktora eğitimim sürecinde tanıştığım, yardımları ve dostluklarıyla her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Öğr. Gör. Dr. Melek YAMAN'a, Öğr. Gör. Nihan ÖRÜKLÜ'ye, Doç. Dr. Atiye Seda Yar SAĞLAM'a ve Doç.Dr. Elçin Özgür BÜYÜKATALAY'a sevgi ve saygılarımla teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli Biyolog Emin ATEŞ ve Erişkin Hematoloji Laboratuvarı'daki tüm çalışma arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Ayrıca öğrenim hayatımın ilk gününden bugüne kadar maddi ve manevi destekleri ve sevgileri ile hep yanımda olan çok değerli annem Nurperi GÖKÇEN'e, babam Bordan GÖKÇEN'e, ağabeyim ONAT GÖKÇEN'e ve yeğenim Bartu GÖKÇEN'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xi

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xii

RESİMLERİN LİSTESİ xvii

SİMGELER VE KISALTMALAR xviii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. B Lenfositler ve Gelişim Süreci 5

2.2. B Hücrelerinin Gelişim Aşamaları 7

2.2.1. Pro-B evresi 7

2.2.2. Pre-B evresi 8

2.2.3. İmmatür B hücreleri 10

2.2.4. Matür B hücreleri 10

2.3. Apoptoz 12

2.3.1. İntrinsik apoptoz yolağı 14

2.3.2. Ekstrinsik apoptoz yolağı 16

2.4. KLL 17

2.4.1. Sıklık 17

2.4.2. Tanı 17

2.4.3. Klinik seyir ve prognostik faktörler 18

2.4.4. Evreleme 23

Sayfa

2.4.5. KLL için apoptoz temelli stratejiler 23

2.5. Dihidroartemisinin 27

2.6. Fludarabin 30

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 33

3.1. Araç ve Gereçler 33

3.1.1. PGA-1 hücre serisi 33

3.1.2. CII hücre serisi 34

3.1.3. MEC-1 hücre serisi 35

3.1.4. Kullanılan cihazlar 35

3.1.5. Kullanılan sarflar 36

3.1.6. Kullanılan kitler 36

3.1.7. Kullanılan kimyasal malzemeler 37

3.2. Yöntemler 37

3.2.1. Kanser hücre serilerinin kültürü 37

3.2.2. 10 mM stok DHA ve FLU çözeltilerinin hazırlanması 38

3.2.3. DHA, FLU ve DHA+FLU uygulanan PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinde etkin dozun XTT yöntemi ile belirlenmesi 38

3.2.4. Hücre kültüründen total RNA'nın elde edilmesi 40

3.2.5. Komplementer DNA (cDNA) sentezi 41

3.2.6. Gen ifadesinin Real-Time PCR ile belirlenmesi 42

3.2.7. TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve ABL1 genleri için Real-Time PCR tepkime karışımı 42

3.2.8. Light Cycler (LC) deney programi 43

3.2.9. Apoptoz tespiti : Anneksin V-FITC/PI yöntemi 44

3.2.10. Akım sitometri ile TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax, aktif Kaspaz-3 düzeylerinin belirlenmesi 45

3.3. İstatistik analizler 46

Sayfa

4. BULGULAR 47

4.1. İnsan Kronik Lenfositik Lösemi Hücre Serileri 47

4.1.1. İnsan kronik lenfositik lösemi hücre serilerinin çoğaltılması 47

4.2. Deney Grupları 49

4.3. DHA ve FLU'nun İnsan Kronik Lenfositik Lösemi Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkileri 50

4.3.1. DHA ve FLU'nun PGA-1 hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri 50

4.3.2. DHA ve FLU'nun CII hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri 53

4.3.3. DHA ve FLU'nun MEC-1 hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri 55

4.4. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi 57

4.4.1. PGA-1 hücrelerine uygulanan DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} değerlerinin belirlenmesi 58

4.4.2. CII hücrelerine uygulanan DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} değerlerinin belirlenmesi 61

4.4.3. MEC-1 hücrelerine uygulanan DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} değerlerinin belirlenmesi 64

4.5. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirmesi 68

4.6. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırması 69

4.6.1. PGA-1 hücrelerinde gen ifade düzylerinin karşılaştırılması 69

4.6.2. CII hücrelerinde gen ifade düzylerinin karşılaştırılması 71

4.6.3. MEC-1 hücrelerinde gen ifade düzylerinin karşılaştırılması 72

4.7. Akım sitometri ile Apoptoz Tayini 73

4.7.1. PGA-1 hücrelerinde akım sitometri ile apoptoz tayini 74

4.7.2. CII hücrelerinde akım sitometri ile apoptoz tayini 76

4.7.3. MEC-1 hücrelerinde akım sitometri ile apoptoz tayini 77

4.8. Akım Sitometri ile Protein İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması 79

4.8.1. PGA-1 hücrelerinde akım sitometri ile protein ifade düzeylerinin karşılaştırılması 79

Sayfa

4.8.2. CII hücrelerinde akım sitometri ile protein ifade düzeylerinin karşılaştırılması 87

4.8.3. MEC-1 hücrelerinde akım sitometri ile protein ifade düzeylerinin karşılaştırılması 95

5. TARTIŞMA 103

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 111

KAYNAKLAR 113

ÖZGEÇMİŞ 135

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. KLL evreleme sistemleri 23

Çizelge 3.1. PGA-1 hücre serisi..... 33

Çizelge 3.2. CII hücre serisi..... 34

Çizelge 3.3. MEC-1 hücre serisi 35

Çizelge 3.4. Cihazlar..... 35

Çizelge 3.5. Sarflar 36

Çizelge 3. 6. Kitler..... 36

Çizelge 3.7. Kimyasallar..... 37

Çizelge 3.8. Ters transkripsiyon PCR (RT-PCR) tepkime karışımın hazırlanması..... 41

Çizelge 3.9. Otomatik ısı döngüleyici cihazında uygulanan program 41

Çizelge 3.10. TCTP ve Mcl-1 genlerine özgü primer ve prob dizileri 42

Çizelge 3.11. Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerine özgü primer dizileri ve prob numaraları..... 42

Çizelge 3.12. TCTP ve Mcl-1 Real-Time PCR tepkime karışımı 43

Çizelge 3.13. Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 Real-Time PCR tepkime karışımı 43

Çizelge 3.14. ABL1 Real-Time PCR tepkime karışımı..... 43

Çizelge 3.15. TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve ABL1 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı 43

Çizelge 4.1. KLL hücre serilerinin özellikleri 47

Çizelge 4.2. Deney grupları ve KLL hücre serilerine uygulanan DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} değerleri 68

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. B hücre gelişimi 6

Şekil 2.2. Pre-B hücre reseptörü 9

Şekil 2.3. Apoptoz 13

Şekil 2.4. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolakları 14

Şekil 2.5. Bcl-2 ailesi üyeleri 15

Şekil 2.6. B-KLL hücrelerinin kökenleri 20

Şekil 2.7. Kronik lenfositik löseminin genetik etkenleri 22

Şekil 2.8. TCTP ve apoptoz 25

Şekil 2.9. TCTP protein stabilitesinin regülasyonu: Hsp27 ve Mcl-1'in, TCTP'yi degradasyona karşı koruması ve apoptozu önlemesi 26

Şekil 2.10. Anti-kanser aktiviteli artemisinin ve türevlerinin kimyasal yapıları 27

Şekil 2.11. DHA'nın tümör hücreleri üzerine etki yolakları 29

Şekil 2.12. DHA'nın TCTP'ye bağlanmasının biyolojik sonuçları 30

Şekil 2.13. Fludurabin'in metabolizması ve etki mekanizması 31

Şekil 4.1. PGA-1 hücrelerinin DHA'nın seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları 51

Şekil 4.2. PGA-1 hücrelerinin FLU'nun seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları 52

Şekil 4.3. PGA-1 hücrelerinin DHA+FLU'nun seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları 52

Şekil 4.4. CII hücrelerinin DHA'nın seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları 53

Şekil 4.5. CII hücrelerinin FLU'nun seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları 54

Şekil 4.6. CII hücrelerinin DHA+FLU'nun seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları 55

Şekil 4.7. MEC-1 hücrelerinin DHA'nın seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları 56

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.8. MEC-1 hücrelerinin FLU'nun seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları 56

Şekil 4.9. MEC-1 hücrelerinin DHA+FLU'nun seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları 57

Şekil 4.10. PGA-1 hücrelerinin DHA'nın 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları yüzdesi 58

Şekil 4.11. PGA-1 hücrelerinin FLU'nun 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları yüzdesi 59

Şekil 4.12. PGA-1 hücrelerinin DHA+FLU'nun (2,5uM DHA + 5uM FLU)-(70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında uygulanarak 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları 60

Şekil 4.13. CII hücrelerinin DHA'nın 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları 61

Şekil 4.14. CII hücrelerinin FLU'nun 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları 62

Şekil 4.15. CII hücrelerinin DHA+FLU'nun (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında uygulanarak 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları 63

Şekil 4.16. MEC-1 hücrelerinin DHA'nın 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları 64

Şekil 4.17. MEC-1 hücrelerinin FLU'nun 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları 65

Şekil 4.18. MEC-1 hücrelerinin DHA+FLU'nun (2,5uM DHA + 5uM FLU)-(70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında uygulanarak 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları 66

Şekil 4.19. PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinin DHA, FLU ve DHA+FLU ile 24 saat inkübasyonu sonundaki canlılık oranlarının karşılaştırılması 67

Şekil 4.20. PGA-1 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak DHA, FLU ve bu ajanların birlikte uygulanması sonrasında TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri ABL1 mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi 70

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.21. CII hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak DHA, FLU ve bu ajanların birlikte uygulanması sonrasında TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri ABL1 mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi 71

Şekil 4.22. MEC-1 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak DHA, FLU ve bu ajanların birlikte uygulanması sonrasında TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri ABL1 mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi..... 73

Şekil 4.23. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda PGA-1 hücrelerinin akım sitometride Anneksin V-FITC/PI ile analiz edilen apoptoz oranlarının karşılaştırılması 75

Şekil 4.24. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda PGA-1 hücrelerinin akım sitometride Anneksin V-FITC/PI ile apoptoz analizleri 75

Şekil 4.25. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda CII hücrelerinin akım sitometride Anneksin V-FITC/PI ile analiz edilen apoptoz oranlarının karşılaştırılması 76

Şekil 4.26. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda CII hücrelerinin akım sitometride Anneksin V-FITC/PI ile apoptoz analizleri 77

Şekil 4.27. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda MEC-1 hücrelerinin akım sitometride Anneksin V-FITC/PI ile analiz edilen apoptoz oranlarının karşılaştırılması 78

Şekil 4.28. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda MEC-1 hücrelerinin akım sitometride Anneksin V-FITC/PI ile apoptoz analizleri 78

Şekil 4.29. PGA-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra TCTP protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi 80

Şekil 4.30. PGA-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Mcl-1 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi 81

Şekil 4.31. PGA-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Bcl-2 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi 82

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.32. PGA-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Bax protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi 83

Şekil 4.33. PGA-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi..... 85

Şekil 4.34. PGA-1 hücrelerinde DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin analizi için akım sitometride belirlenen MFI değerlerinin karşılaştırılması..... 86

Şekil 4.35. CII hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra TCTP protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi..... 88

Şekil 4.36. CII hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Mcl-1 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi 89

Şekil 4.37. CII hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Bcl-2 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi 90

Şekil 4.38. CII hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Bax protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi..... 91

Şekil 4.39. CII hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi 93

Şekil 4.40. CII hücrelerinde DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin analizi için akım sitometride belirlenen MFI değerlerinin karşılaştırılması..... 94

Şekil 4.41. MEC-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra TCTP protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi..... 96

Şekil 4.42. MEC-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Mcl-1 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi..... 97

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.43. MEC-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Bcl-2 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi..... 98

Şekil 4.44. MEC-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Bax protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi..... 99

Şekil 4.45. MEC-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi..... 101

Şekil 4.46. MEC-1 hücrelerinde DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 ifadelerine etkilerinin analizi için akım sitometride belirlenen MFI değerlerinin karşılaştırılması 102

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 4.1. PGA-1 hücre serisinin mikroskop altında görüntüsü..... 48

Resim 4.2. CII hücre serisinin mikroskop altında görüntüsü..... 48

Resim 4.3. MEC-1 hücre serisinin mikroskop altında görüntüsü..... 49

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
Dk	Dakika
dL	Desilitre
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mL	Mililitre
mm^3	Milimetre küp
nm	Nanomolar
^oC	Santigrad derece
rpm	Dakika başına dönme sayısı *(Revolutions per minute)*
s	**S**aat
sn	Saniye
U	Ünite
Ug	Mikrogram
uL	Mikrolitre
uM	Mikromolar
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
κ	Kappa
λ	Lambda

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
ABL	Abelson murin lösemi
ADP	Adenozin difosfat

Kısaltmalar	Açıklamalar
AID	Aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
APO	Apoptoz antijeni *(Apoptosis antigen)*
ARM	Artemether
ARS	Artemisinin
ART	Artesunat
ATM	Ataksi telenjiektazinin mutasyonlu geni
ATP	Adenozin trifosfat *(Adenosine triphosphate)*
Bad	BCL2 ilişkili ölümü kolaylaştırıcı *(Bcl-2-associated death promoter*)
Bax	BCL2 ilişkili X (*Bcl-2-associated X*)
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2 (*B cell lymphoma 2*)
Bcl-w	BCL2 benzeri protein 2 (*Bcl-2-like protein 2*)
Bcl-xL	B hücreli lenfoma ekstra büyük (*B-cell lymphoma-extra large*)
BCR	Kırılma bölgesi (*Breakpoint cluster region*)
BH	Bcl-2 homoloji bölgesi
BHR	B hücre reseptörü
Bid	BH3 ile etkileşen bölge ölüm agonisti *(BH3 interacting-domain death agonist)*
Bim	BCL-2 ile etkileşen hücre ölümünün düzenleyicisi *(BCL-2 interacting mediator of cell death)*
Bmf	Bcl-2 modifiye edici faktör
Ca^{+2}	Kalsiyum
CAD	Kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz *(Caspase-activated DNase)*
CD	İnsan Lökosit Farklılaşma Antijenleri *(Cluster of differentiation)*
CDK	Siklin bağımlı kinaz *(Cyclin-dependent kinase)*
cDNA	Komplementer DNA
CO_2	Karbondioksit
Cp	Crossing point
CREB	cAMP cevap elementini bağlayan protein (*cAMP response element binding)*
CXCR4	CXC-kemokin reseptörü 4

Kısaltmalar	Açıklamalar
DHA	Dihidroartemisinin
DISC	Ölümü indükleyen sinyal kompleksi *(Death-inducing signaling complex)*
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
DR	Ölüm reseptörü *(Death receptor)*
E2A	Transkripsiyon faktörü
EBF	Transkripsiyon faktörü
EBV	Epstein-Barr virus
FADD	Fas ile ilişkili ölüm bölgesi *(Fas-associated protein with death domain)*
FBS	Fetal sığır serumu *(Fetal bovine serum)*
FDH	Foliküler dendritik hücreler
FISH	Floresan in-situ hibridizasyon
FITC	Floresan izotiyosiyanat *(Fluorescein isothiocyanate)*
FLIP	Flice inhibitör protein
Flt3	FMS-benzeri tirozin kinaz 3 *(fms-like tyrosine kinase)*
FLU	Fludarabin
FOXO1	Forkhead box protein 01
FRET	Floresans rezonans enerji transferi
GM	Germinal merkez
Hb	Hemoglobin
HHV	İnsan herpes virüsü ***(****Human herpes virus)*
HRF	Histamin salgılama faktörü *(Histamine releasing factor)*
Hrk	Harakiri
Hsp27	Isı şok protein 27 *(Heat shock protein)*
HTF	Holotransferrin
HUVEC	İnsan umbilikal ven endotel hücreleri *(Human umbilical vein endothelial cells)*
ICAD	Kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz inhibitörü *(Inhibitor of caspase-3 activated DNase)*

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
Ig	İmmunglobulin
IgV$_H$	İmmunglobulin değişken bölge ağır zinciri *(Immunglobulin heavy chain variable region)*
IL	İnterlökin
Kaspaz	Sistein bağımlı aspartata spesifik proteaz
KDR/flk-1	Tirozin protein kinaz/Fetal karaciğer kinaz
KLHL	Kelch motifi içeren protein ailesi *(Kelch-like)*
KLL	Kronik lenfositik lösemi
LC	Light cycler
LYN	Tirozin-protein kinaz
MAK	Mitokondriyal apoptozla indüklenmiş kanal
Mcl-1	Myeloid hücre lösemisi-1
MFI	Ortalama floresan yoğunluğu *(Mean fluorescence intensity)*
MgCI2	Magnezyum klorür
miRNA	MikroRNA
MOMP	Mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu *(Mitochondrial outer membrane permeabilization)*
MORT1	Reseptörle indüklenmiş toksisite mediyatörü *(Mediator of receptor-induced toxicity-1)*
MRD	Minimal kalıntı hastalığı (*Minimal residual disease)*
mRNA	Mesajcı RNA *(Messenger RNA)*
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi *(Mammalian target of rapamycin)*
MYD88	Myeloid farklılaşma birincil yanıt proteini 88 *(Myeloid differentiation primary response protein)*
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
NK	Doğal öldürücü hücre *(Natural killer)*
Noxa	Forbol-12-miristat-13-asetatla indüklenmiş protein 1 *(Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)*
OD	Optik yoğunluk *(Optical Density)*
p53	Protein 53
Pax5	Eşli kutu protein 5 (*Paired box protein 5*)

Kısaltmalar	Açıklamalar
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi *(Phosphate-buffered saline)*
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (*Polymerase chain reaction)*
PI	Propidyum iyodür
PI3K	Fosfoinozitid 3-kinaz *(Phosphoinositide 3-kinase)*
PtdSer	Fosfatidilserin *(Phosphatidylserine)*
Puma	p53 ile regüle edilen apoptoz modülatörü *(p53 upregulated modulator of apoptosis)*
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
ROCK1	Rho-ilişkili protein kinaz 1 *(Rho-associated protein kinase 1)*
ROT	Reaktif oksijen türleri
RPMI	*(Roswell Park Memorial Institute)*
RT-PCR	Ters transkriptaz-polimeraz zincir tepkimesi *(Reverse transcription polymerase chain reaction)*
SF3B1	Ekleme faktörü 3b alt birimi 1 (*Splicing factor 3B subunit 1)*
SHIP1	İnozitol lipid fosfataz *(Src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1)*
SHM	Somatik hipermutasyon
STL	Sitotoksik T lenfosit
SYK	Dalak tirozin kinaz *(spleen tyrosine kinase)*
Taq	*(Thermus aquaticus)*
TCTP	Translasyonel kontrol edilen tümör-ilişkili protein (*translationally controlled tumour protein)*
Tfh	Foliküler T hücreleri
TNF	Tümör nekroz faktörü *(Tumour necrosis factor)*
UPL	Universal prob kütüphanesi
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü *(Vascular endothelial growth factor)*
VLA-4	Çok geç antijen-*4 (Very Late Antigen-4)*
XKRS	Xk-ilişkili protein *(Xk-related protein)*
XPO1	Eksportin 1 *(Exportin 1)*

Kısaltmalar	Açıklamalar
XTT	2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid tuzu *(2,3-Bis-(2- methoxy 4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide salt)*
ZAP70	Zeta zinciri ilişkili protein 70 *(Zeta-chain-associated protein kinase 70)*
κ	Kappa
λ	Lambda

1. GİRİŞ

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL), batı dünyası ülkelerinde en sık görülen lösemi tipidir. KLL'li hastaların tedavisinin karmaşıklığı; yeni biyolojik ajanların ortaya çıkması, belirleyici moleküler belirteçlerin tanımlanması ve minimal kalıntı hastalığını (MRD) değerlendirmek için daha hassas ve ileri tekniklerin girişinin bir sonucu olarak son birkaç yıldır önemli ölçüde artmıştır. Ortalama tanı yaşı, 67 ile 72 yaş arasında değişmektedir. Erkek hastalar kadın hastalara göre daha çok (1,7:1) etkilenmektedir [1, 2].

KLL, olgun B lenfositlerin malign dönüşümünden oluşan bir kanserdir. Tanı için periferik kandaki monoklonal B-lenfosit sayısının mm^3'te 5000'in üzerinde olması ve bu lenfositlerin akım sitometrik olarak KLL için özgül immünofenotipik özellik taşıması gerekmektedir. Karakteristik immünofenotip, CD5+, CD19+, CD20+ (düşük), CD23+, sIg (yüzey immunoglobulin, düşük), CD79b+(düşük), FMC7-negatifliğidir [1, 3, 4].

KLL'nin klinik gidişatı heterojendir ve yıllarca tedavi gerektirmeyen hastalardan, tanıdan hemen sonra tedavisi gereken hastalara kadar değişmektedir. Semptomatik hastalarda değişik düzeylerde anemi veya trombositopeni görülebilmekte ve bazı hastalarda lenfadenopati ve hepatosplenomegali de görülebilmektedir [2, 5]. Bu heterojeniteyi tanımlamak için Rai ve Binet, evreleme sistemi geliştirmişlerdir [6, 7]. Buna göre İmmunglobulin Değişken Bölge Ağır Zinciri (IgV_H) mutasyonu olmaması, Zeta Zinciri İlişkili Protein 70 (ZAP70) ve CD38'in ifadelenmesi, 11q12 ve 17p delesyonu olumsuz prognostik belirteçlerdir [8].

Apoptotik programdan kaçma, kanserin ayırıcı edici özelliklerinden biridir ve tedavilere dirençte önemli bir mekanizmayı yansıtmaktadır. KLL de apoptoz mekanizmasının bozukluğuyla karakterizedir. KLL, kan hücrelerinin proliferasyonu ve apoptoza uğrayabilmeleri arasındaki bir dengesizlik ile ilişkilidir. Bu yüzden KLL'de apoptozu hedef alan terapötik stratejilerin geliştirilmesi, çok önemli bir konudur [9].

Birçok kemoterapötik ajan, bcl-2 ailesi mitokondriye bağlı apoptotik yolağın protein aktivasyonuyla hedef hücreleri öldürmektedir. Sitoplazmik proteinlerin bu ailesi, apoptozu baskılayan (Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL gibi) veya apoptozu arttıran (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim ve Puma gibi) üyelerin varlığıyla karakterizedir. KLL'de B lenfositlerin artmış sağ kalımının,

özellikle apoptozu baskılayan proteinlerin ifadelenmesinde artışın ve apoptozu arttıranlarınınkinin ifadelenmesinde azalmanın bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin arasındaki dengesizliğin, KLL'de apoptoza direnç mekanizmalarından biri ve bundan dolayı KLL B hücrelerinin uzun ömürlü olmasını belirleyen önemli bir faktör olduğu görülmektedir [10].

Dihidroartemisinin (DHA), artemisinin bir metabolitidir ve etkili bir anti-malaryal ajandır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, DHA'nın birçok farklı tümör hücresinde apoptotik hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir [11-16]. Bununla birlikte, DHA'nın KLL hücreleri üzerine anti-kanser etkisinin olup olmadığı da henüz bilinmemektedir.

Translasyonel Olarak Kontrol Edilen Tümör-ilişkili Protein TCTP (gen sembolü TPT1, p21, p23, Q23, fortilin veya histamin salgılama faktörü, HRF olarak da adlandırılır), temelde tüm ökaryotik organizmalarda mevcut olan, filogenetik olarak yüksek düzeyde korunmuş bir proteindir. TCTP birçok doku ve hücre tipinde ifade edilir. Birçok temel hücre biyolojik ve hastalık süreçlerine katılmaktadır [17].

TCTP'nin anti-apoptotik aktivitesi bulunmaktadır ve birçok kanserde aşırı ifade edilmektedir. Bunun Mcl-1 ve/veya Bcl-XL ile ilişkiye girmesiyle ilgisi olduğu düşünülmektedir. TCTP, anti-apoptotik protein Mcl-1'i stabilize etmektedir ve Bcl-XL (BCL2L1 olarak da bilinmektedir) ile etkileşmektedir. Bu yüzden önerilen modellerden birisi, TCTP'nin Mcl-1 ve Bcl-XL'i aktive ederek Bax'ı inhibe etmesidir. TCTP'nin aşırı ifadesi apoptozu engellerken, TCTP düzeyinin azaltılması kanser hücre dizilerinde malign fenotipi tersine çevirmiştir [18-20].

TCTP'nin, DHA'nın moleküler bir hedefi olduğu bildirilmektedir. DHA'nın; TCTP'ye bağlandığı, TCTP'nin ubikuitinlenmesini arttırdığı, proteozom-bağlı bir şekilde TCTP'nin yarı ömrünü kısalttığı ve birçok hücrede TCTP'nin hücresel düzeylerini azalttığı bildirilmektedir. DHA'nın yeni bir insan TCTP inhibitörü olduğu öne sürülmektedir [21, 22].

Bu çalışmada, Dihidroartemisin'in insan kronik lenfositik lösemi hücre serilerinde apoptoza etkilerini immünomoleküler olarak belirlemeyi amaçlamaktayız. Bu amaç çerçevesinde Dihidroartemisin, hali hazırda KLL hastalarının tedavisinde kullanılan en

etkin kemoterapötiklerden biri olan Fludarabin ile karşılaştırılacak ve sinerjistik etkilerine de bakılacaktır.

Elde edeceğimiz sonuçlarla, Dihidroartemisin'in KLL'nin klinik tedavisinde olası potansiyel bir anti-kanser ajan olarak kullanılmasına dair yapılacak ileriki çalışmalar ve etkili tedavilerin geliştirilmesi için bir temel oluşturması hedeflenmektedir.

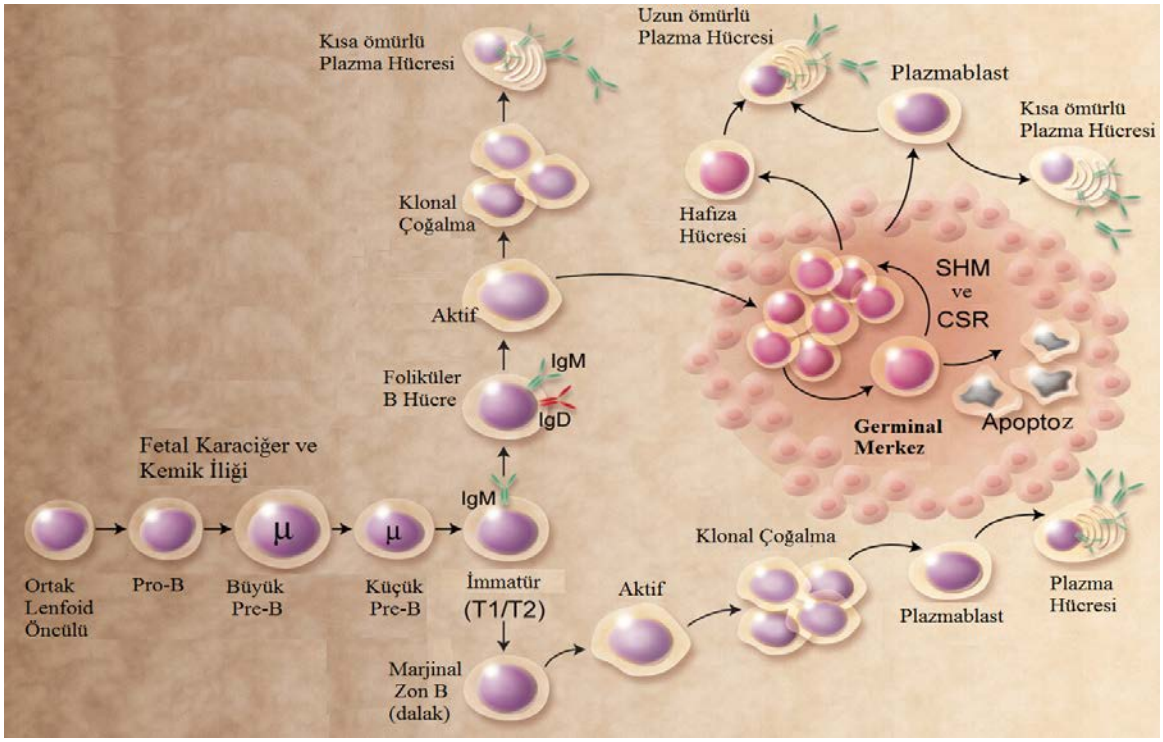
2. GENEL BİLGİLER

2.1. B Lenfositler ve Gelişim Süreci

Kandaki lenfositlerin % 5-15'ini B lenfositler oluşturmaktadır. Bu hücreler dalak, lenf bezleri, tonsiller ve mukoza ile ilişkili lenfoid dokuda da bulunmaktadır. B hücreleri, humoral immün yanıtta rol almakta ve antijenle karşılaştıktan sonra yüksek miktarda spesifik antikor üreten plazma hücrelerine dönüşmektedir [23]. Antikor üretimine ek olarak B hücreleri, antijen sunumu ve düzenleyici sitokin üretimi gibi normal immün sistem fonksiyonu için kritik olan çeşitli başka rolleri de gerçekleştirmektedir. Ayrıca her bir fonksiyonun kapsamı ve doğası; ilgili B hücre alt grubu, anatomik içerik ve indükleyen uyarının doğasına bağlı olarak değişmektedir [24]. B hücre gelişimi, seçilimi ve fonksiyonundaki bozukluklar; otoimmünite, maligniteler, immün yetmezlikler ve alerjiye neden olmaktadır [23, 25].

Hematopoetik kök hücreler, ortak lenfoid öncüllere farklılaşmaktadır. Ortak lenfoid öncüllerden T veya B lenfosit yönüne gelişim bazı hücre yüzey moleküllerinden alınan sinyaller ve bunlar aracılığıyla spesifik transkripsiyon düzenleyicilerinin indüklenmesiyle ortaya çıkmaktadır. Hematopoetik kök hücreden ortak lenfoid öncül oluşumunda transkripsiyon faktörlerinden Ikaros ve PU.1 önemlidir. Ikaros ve PU.1, temel sinyalizasyon reseptörlerinin (Flt3, c-Kit ve IL-7R alfa) ifadelenmesini düzenleyerek lenfoid öncüllerin gelişimini kontrol etmede paralel yolaklarda rol oynamaktadır [26-29]. Tüm ökaryotik hücrelerde olduğu gibi, B hücre soyunun oluşması, transkripsiyon faktörleri ve çapraz düzenlemeye bağlıdır [30]. Dolayısıyla kazanılan B hücre kimliği, hem bir B hücre transkripsiyonel programın başlamasına hem de diğer immün hücre potansiyellerinin kaybına yol açmaktadır [31]. B lenfosit soyu gelişiminin ana özellikleri; immünoglobulin (Ig) ağır ve hafif zincir lokuslarındaki gen rearanjmanının başlaması ve Pax5 başta olmak üzere çeşitli temel transkripsiyon faktörlerinin ifadelenmesine bağlıdır [32, 33]. Bir kez ortak lenfoid progenitörler, B lenfosit yönünde geliştiğinde transkripsiyon faktörü E2A, EBF ve Pax5'i aktif hale getirmek için kromatin işaretlerini değiştirmekte ve böylece B hücreye spesifik genlerin bir kaskatı aktifleşmektedir [32, 34]. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, B hücre gelişiminde mikroRNA'ların (MiR) özellikle de Mir-150'nin düzenleyici yönlerini vurgulamıştır [35, 36].

B hücre gelişimi, antijenden bağımsız ve antijen varlığına bağımlı olarak iki kısma ayrılabilmektedir [37]. Organizmada B hücreleri, ilk olarak embriyonik dönemde ortaya çıkmakta ve yolk kesesinde gelişmektedir. Daha sonra karaciğer ve sonra da kemik iliğinde yapılmaktadır [38]. Lenfoid kök hücrelerden önce progenitör B hücreler (pro-B) ve daha sonra prekürsör B hücreler (pre-B) oluşmaktadır. Stromal hücreler ve gelişen B hücre öncülleri arasında hücre adezyon molekülleri ve bunların ligandları aracılığıyla etkileşim olmaktadır. Bu hücreler büyüme faktörleri üreterek lenfosit farklılaşması ve çoğalmasını uyarmaktadır. Öncül bir hücrenin lenfoid seriye yönelmesinde kilit faktör antijen reseptör genlerinin yeniden düzenlenmesidir. Transkripsiyon faktörleri, B hücre öncüllerinin oluşmasını yönlendirmektedir [39, 40]. Öncül B hücreler kemik iliğindeki stromal hücrelerin yardımıyla immatür B hücre evresine geçmektedir. İmmatür B hücrelerinin matür B hücrelerine dönüşmesi ise dalak gibi periferal lenfoid organlarda gerçekleşmektedir. Bu aşamada antijen bağımlı kısım ortaya çıkmaktadır. B hücreler, spesifik reseptörleriyle bir antijeni tanıdıkları zaman çoğalmaya başlamakta ve plazma veya hafıza hücrelerine farklılaşmaktadır [37]. Fetal karaciğer kökenli kök hücrelerden B1-B hücreler olarak adlandırılan ve daha çok kemirgenlerde tanımlanmış olan B hücre tipi gelişmektedir. Dolaşımda bulunan B hücrelerinin büyük kısmını oluşturan hücreler ise kemik iliği kökenli kök hücrelerdir (folliküler B hücreleri) (Şekil 2.1) [40, 41].



Şekil 2.1. B hücre gelişimi [42]

2.2. B Hücrelerinin Gelişim Aşamaları

2.2.1. Pro-B evresi

B-hücre gelişiminin kemik iliğine bağlı erken evreleri, V(variable – değişken), D (diversity – çeşitlilik) ve J (joining – birleştirici) immünoglobulin gen segmentlerinin fonksiyonel rearanjman süreci boyunca yapılandırılmaktadır. Ağır zincirin (H –heavy chain); VH, DH ve JH rearanjmanlarıyla birlikte hafif zincir (L –light chain) gen segmentlerinin VL-JL rearanjmanları, 5 x 10^{13}'den fazla farklı antijeni tanıma kabiliyeti olan antikorları ifade eden bir B hücre repertuvarı oluşturmaktadır [25].

Pro-B evresi, ortak lenfoid öncülden sonra ilk ortaya çıkan evredir. Pro-B hücreleri, Immünglobulin (Ig) üretmemektedir, fakat diğer immatür hücrelerden yüzey moleküllerinin CD19 ve CD10'un pozitif olmasıyla ayrılmaktadır [43]. Transkripsiyon faktörleri E2A, EBF ve FOXO1, gen rearanjmanının meydana gelebilmesi için V(D)J rekombinazın RAG1 ve RAG2 bileşenleri gibi çeşitli kilit proteinlerin ifadelenmesini indüklemektedir. RAG1(rekombinasyonu aktive eden gen 1)-RAG2 protein kompleksi, gen segmentleri arasında çift-zincirli DNA kırıkları ve **rekombinasyon sinyal dizileri** olarak da bilinen spesifik tanınma bölgeleri meydana getirmektedir. Böylelikle E2A ve EBF, Ig ağır zincir lokusunda rekombinasyonun başlamasına izin vermektedir. E2A ve EBF yokluğunda, B gelişiminde belirlenebilen en erken basamak olan D-J_H birleşmesi gerçekleşmemektedir. E2A ve EBF tarafından indüklenen bir başka kilit protein, transkripsiyon faktörü Pax-5'dir. Pax-5, B hücre aktivatör protein (BASP) olarak bilinen proteinin bir izoformudur. Pax-5'in hedefleri; B hücre ko-reseptör bileşeni CD19 için ve hem pre-B hücre reseptörü hem de B hücre reseptörünün bir sinyalizasyon bileşeni olan Igα için genlerdir. Pax-5 yokluğunda B hücre gelişimi gözlenmemektedir. Ayrıca Pax-5; pro-B hücresinin daha ileri gelişimi için ve olgun B hücre antijen reseptöründen sinyalizasyon için gerekli olan bir sinyalizasyon molekülü olan B hücre bağlayıcı proteinin (BLNK) ifadelenmesini de indüklemektedir [43-45].

Ig genlerindeki ilk rekombinasyon ağır zincir lokuslarında meydana gelmektedir. Bu rekombinasyon D ve J gen segmentlerini bir araya getirmektedir. Bu evre **erken pro B** evresi olarak da adlandırılmaktadır. D-J rekombinasyonundan sonra seçilen V segmenti,

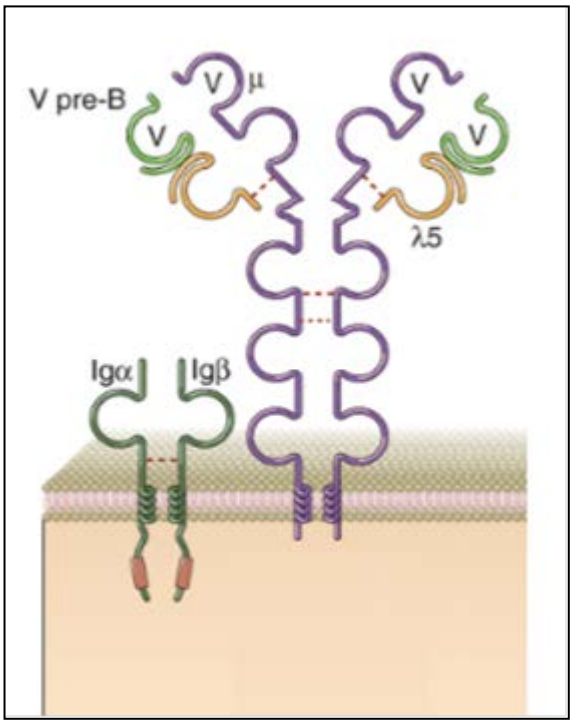
DJ segmenti ile birleşmektedir. Bu evre ise **geç pro-B evresi** olarak da adlandırılmaktadır [45].

IgH zincirindeki V-DJ rekombinasyonu, yalnızca adanmış B lenfosit prekürsörlerinde meydana gelmektedir ve Ig ifadelenmesinde kritik bir olaydır. Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi, en belirgin olarak bu aşamada ifade olur. Tdt, V(D)J rekombinasyonu süresince lenfosit antijen reseptörlerinin çeşitliliğini meydana getirmede başlıca rol oynayan bir DNA polimerazdır. TdT, rearanje olmuş gen segmentlerinin arasındaki bağlantılarda nontemplate nükleotitleri (N-nükleotitler) eklemektedir. Gelişim sürecinde ifadelenmesi azalarak hafif zincirin V-J rearanjmanı tamamlanmadan önce durmaktadır. Bu sebeple nükleotid eklenip çıkarılmasıyla oluşan bileşke çeşitliliği ağır zincirde daha belirgindir [43, 46, 47].

Ağır zincir C bölgesi eksonları, uzak uçtaki J segmentleri ve ve J-C intronunu kapsayan DNA ile VDJ kompleksinden ayrı kalmaktadır. Rearanje olmuş Ig ağır zincir geni, rearanje olmuş VDJ kompleksini ve Cμ eksonlarını içeren bir primer transkript yapmak için kopyalanmaktadır. Cμ nükleer RNA, ardışık iki poliadenilasyon bölgesinden birinin aşağı yönünde kesilmektedir ve poli-A kuyrukları denilen birçok adenin nükleotiti, 3′ uca eklenmektedir. Bu nükleer RNA, intronların çıkartılıp eksonların birleştiği bir RNA işlenme süreci olan uç birleştirmeye (splicing) uğramaktadır. Yaklaşık olarak tüm pro-B hücrelerinin yarısı, en az bir kromozomda Ig H lokusunda verimli rearanjmanlar yapmaktadır ve böylece μ ağır zincir proteinini sentezlemeye devam edebilmektedir. Yalnızca üretken rearanjmanlar yapan hücreler sağ kalmakta ve daha ileri düzeyde farklılaşmaktadır [43].

2.2.2. Pre-B evresi

Bir kere fonksiyonel bir Ig μ rearanjmanı yapıldığında, bir hücrenin pro-B hücre olarak adlandırılması bitmekte ve pre-B evresine farklılaşmaktadır. μ, yedek (surrogate) hafif zincirler (λ5 ve V pre-B) ve sinyal iletim proteinleri Igα (CD79a) ve Igβ (CD79b); pre-B hücre reseptörü (pre-BHR) olarak bilinen B soyunun pre-antijen reseptörünü oluşturmaktadır (Şekil 2.2). Pre-BHR kompleksinin oluşması, B hücre gelişimi açısından önemli bir kontrol noktasıdır. Pre-BHR kompleksi, hücrenin sağ kalımı ve proliferasyonu için sinyalleri iletmektedir [48, 49].



Şekil 2.2. Pre-B hücre reseptörü [43]

Bruton tirozin kinaz (Btk) denilen bir kinaz, pre-BHR'nin aşağı yönünde aktive olmakta ve pre-B hücre evresinde ve sonrasında sağ kalım, proliferasyon ve olgunlaşmaya aracılık eden bu reseptörden gelen sinyallerin dağıtımı için gereklidir. İnsanlarda *BTK* genindeki mutasyonlar, B hücre olgunlaşmasında bir bozuklukla karakterize *X'e bağlı agammaglobulinemi* denilen hastalığa neden olmaktadır [50-52].

Pre-BHR kompleksinin herhangi bir bileşeninin eksikliği, *in vivo* koşullarda B hücre gelişimini durdurmaktadır. Bu evrede hücreler, boyutları ve hızlı proliferasyonlarından dolayı büyük pre-B hücreler olarak adlandırılmaktadır. Pre-BHR sinyalizasyonunun bir başka önemli rolü, ikinci IgH allelinde V_H ile DJ_H rekombinasyonunu inhibe etmek ve allelik dışlamayı oluşturmaktır. *Allelik dışlama*, B hücre farklılışmasındaki bir ara basamak ve hücre yüzeyinde ifade edilen tek bir özgüllükte BHR'nin sağlanması için bir mekanizmadır [53-55]. RAG proteinlerinin ifadelenmesi, daha başka *IgH* rekombinasyonunu önlemek için büyük pre-B hücrelerde durmaktadır. Proliferasyon evresinden sonra hücreler, küçük pre-B hücre evresinde G1 fazında tutulmaktadır. Yedek hafif zincirin ifadelenmesi bu evrede durmaktadır. RAG proteinleri, fonksiyonel hafif zincir genlerini üretmek için λ allellerini takiben κ allellerinde immünoglobulin hafif zincir gen rearanjmanını başlatmak için yeniden ifadelenmektedir [53].

Bir κ proteinin yapımını, λ rearanjmanı önlemektedir ve λ rearanjmanı, yalnızca κ rearanjmanı verimli değilse ya da self-reaktif κ hafif zinciri çıkarılmışsa meydana gelmektedir. Sonuç olarak tek bir B hücre klonu, iki hafif zincir tipinden yalnızca bir tanesini ifade edebilmektedir; bu olaya *hafif zincir izotip dışlaması* denilmektedir. Ağır zincir lokusunda olduğu gibi κ veya λ'nın ifadelenmesi, allelik olarak dışlanmaktadır ve herhangi bir zamanda iki parental kromozomdan yalnızca birinden başlamaktadır [43, 56].

Ağır ve hafif zincirlerin başarılı bir şekilde bir araya gelmesi, hücre yüzeyinde tam bir IgM molekülünü oluşturacaktır. Fonksiyonel BHR'nin başarılı bir şekilde ifadelenmesi, B hücre gelişimindeki bir başka önemli kontrol noktasıdır [53].

2.2.3. İmmatür B hücreleri

Oluşan IgM molekülleri, Igα ve Igβ ile ilişkili olarak antijenler için spesifik reseptörler olarak fonksiyon gördükleri hücre yüzeyinde ifade edilmektedir. IgM ifade eden B hücresi, *İmmatür B hücresi* olarak adlandırılmaktadır. İmmatür B hücreleri antijenlere yanıt olarak çoğalmamakta ve farklılaşmamaktadır [43]. Eğer kemik iliğinde yüksek aviditeyle antijenleri tanırlarsa, B hücrelerde reseptörün düzeltilmesi (receptor editing) ya da hücre ölümü olmaktadır. Otoreaktif olmayan bir BHR ifade eden immatür B hücreler, kemik iliğinden ayrılmakta ve diğer periferal lenfoid organlara göç etmeden önce dalakta olgunlaşmalarını tamamlamaktadır [57, 58].

2.2.4. Matür B hücreleri

Matür B hücreleri, BHR'lerin eş antijen-bağlanma bölgerine sahip ve her ikisi de Igα ve Igβ sinyalizasyon alt birimleriyle ilişkili, fakat membrana bağlı ağır zincir izoformları açısından farklılık gösteren IgM ve IgD tiplerini ifade eden B lenfositlerdir [59].

B hücreleri, iki soya ayrılabilmektdir: B-1 ve B-2. Kesin kökenlerinden bağımsız olarak her soyun oluşumlarındaki farklılıkları, antijen reseptör çeşitliliği ve anatomik olarak bulundukları yerlerin farklılıklarını yansıtan hümoral immünite de farklı ama örtüşen rolleri bulunmaktadır [24]. Fetal karaciğer kökenli kök hücrelerden gelişen birçok B hücresi, B1 soyuna farklılaşmaktadır. T hücre bağımsız immün yanıtlardan sorumludur. Birçok murin B-1 hücresi, CD5 molekülünü ifade etmektedir. Erişkinlerde çok sayıda B-1

hücresi, periton ve mukozal bögelerde kendini yenileyen bir popülasyon olarak bulunmaktadır. Doğumdan sonra kemik iliği prekürsörlerinden meydana gelen B lenfositler, B2 soyuna neden olmaktadır. B lenfositlerin başlıca 2 alt grubu B2 B hücre prekürsörlerinden kaynaklanmaktadır. Foliküler B hücreleri; resirküle olan lenfositlerdir. Marjinal zon B (MZB) hücreleri ise kemirgenlerin dalağında bol miktarda bulunmaktadır, bununla birlikte insanlarda lenf nodlarında da bulunabilmektedir [43, 60].

Marjinal zon B hücreleri, tercihen bakterilerin hücre duvarı bileşenleri gibi kan yoluyla geçen antijenlere bağlanan BHR'lerini taşımaktadır. Patojenle ilişkili moleküler paternlerin (PAMP'lar) tanınmasıyla indüklenen Toll-benzeri reseptör (TLR) sinyalleriyle MZB hücreleri, hızlı bir şekilde IgM salgılayan plazma hücrelerine dönüşmekte ve dalağa ulaşan patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. B hücre foliküllerinde bulunan B hücrelerin ("foliküler B hücreleri") aktivasyonu, sekonder lenfoid organların B hücre foliküllerine antijenlerin taşınmasını gerektirmektedir. Antijenin tanınması ve aktivasyonu üzerine foliküler B hücreleri, CD40L ve sitokinler şeklinde yardımcı T hücreler tarafından sağlanan ek aktivasyon sinyallerini almak için yardımcı T hücrelerine MHC II ile antijenlerini sunmaktadır. Bu B-T etkileşimleri, aktif hale gelmiş foliküler B hücrelerin germinal merkezleri (GM) oluşturan hızlı bir şekilde bölünen blastlara farklılaşmasını arttırmaktadır [61].

GM'ler, ikincil lenfoid organlarda farklı bölgelerdedir ve başlıca bölünen B hücreleri, foliküler Tfh hücreleri, foliküler dendritik hücreler (FDH'ler) ve koyu bölge stroma hücrelerinden oluşmaktadır. Germinal merkez içinde, hızlıca prolifere olan B hücrelerin yoğun bir şekilde bulunduğu "koyu bölge" bulunmaktadır. "Sentroblastlar" olarak da adlandıran bu prolifere olan germinal merkez B hücrelerinin iki katına çıkma süresi, 6 ile 12 saat arasındadır, böylece bir hücre bir haftada 5000 kadar yeni B hücresi üretebilmektedir. "Sentrositler" denilen germinal merkezde prolifere olan bu yeni B hücreleri, "açık bölge"de farklılaşma ve seleksiyon süreçlerine uğrayan daha küçük hücrelerdir [62-64].

İkincil lenfoid dokularda antijenle indüklenmiş B hücre aktivasyonu ve farklılaşmasına, GM reaksiyonuna sebep olan gen ifadelenmesindeki dinamik değişiklikler aracılık etmektedir. GM reaksiyonu; klonal genişleme, izotip dönüşümü olarak da bilinen IgH lokusunda sınıf dönüşümü rekombinasyonu, VH genlerinin somatik hipermutasyonu

(SHM) ve affinite olgunlaşması aracılığıyla bir BHR'nin özgün antijenik epitopu için affinite artışının seçilimi ile karakterizedir. Seçilimi başarı ile geçen hücreler, yüksek afiniteli antikor üreten, uzun ömürlü olan plazma hücrelerine veya hafıza hücrelerine farklılaşarak dolaşıma geçmekte ve tüm lenfoid sisteme yayılmaktadır [42].

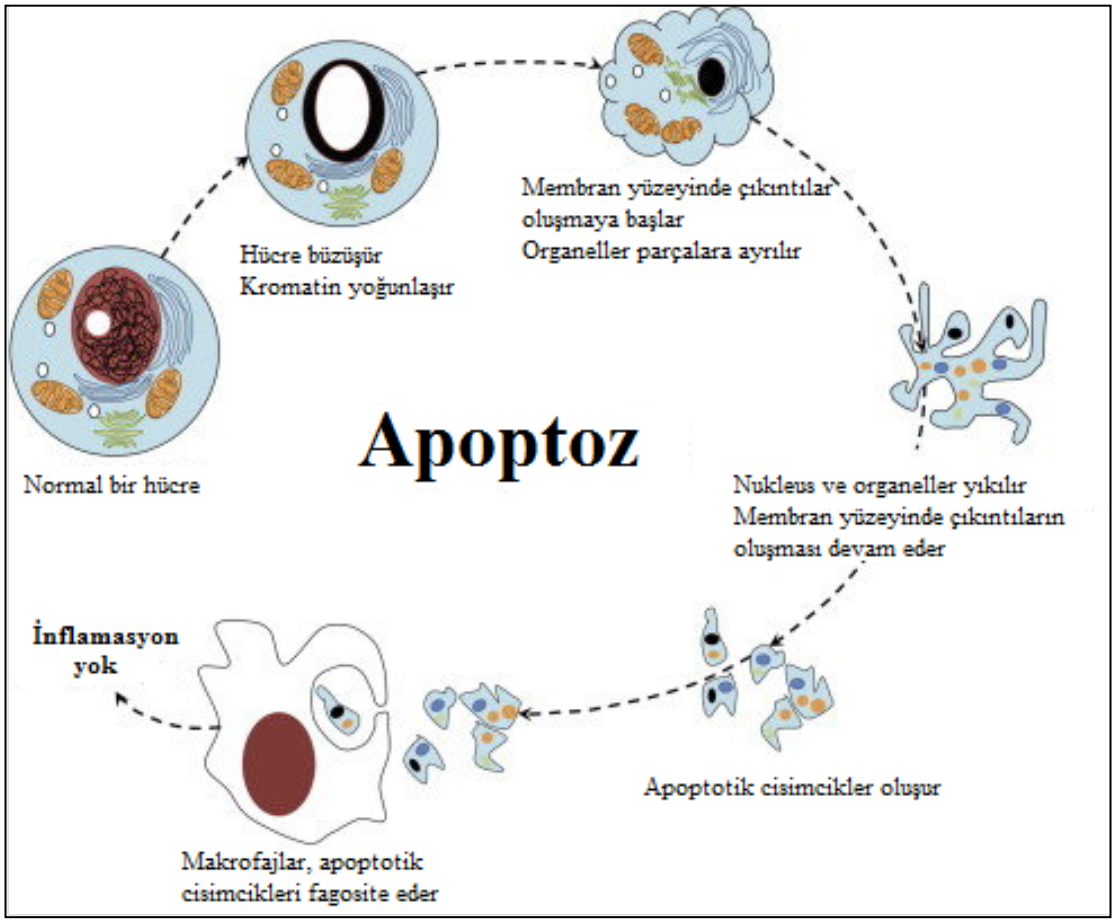
Sınıf dönüşümü rekombinasyonu ve somatik hipermutasyona, aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (AID) olarak belirtilen bir enzimin aracılık ettiği gösterilmiştir. Beklendiği gibi B hücre AID ifadelenmesi, germinal merkezlerde indüklenmektedir [65]. Bu sebeple AID eksikliği olan hastalar, hafıza B hücreleri ve uzun ömürlü plazma hücreleri geliştiremediklerinden dolayı hiper IgM sendromu ve primer immün yetmezlik geçirmektedir [66].

2.3. Apoptoz

Hücre ölüm tiplerinden bir olan apoptoz kelimesi, eski Yunanca'da "bir çiçekten petallerin düşmesi" yada "sonbaharda ağaçtan yaprakların dökülmesi" anlamını taşımaktadır. Apoptoz terimi ilk defa 1972'de John Kerr tarafından tanımlanmıştır ve bir hücreden "apoptotik cisimler"in olmuşmasının morfolojik özelliğini ifade etmektedir [67]. Apoptoz, normal olarak gelişim ve yaşlanma boyunca ve dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak meydana gelmektedir. Ayrıca apoptoz, immün reaksiyonlar gibi bir savunma mekanizmasında ya da hücreler hastalık veya zararlı ajanlar ile hasara uğradığı zaman meydana gelmektedir [68].

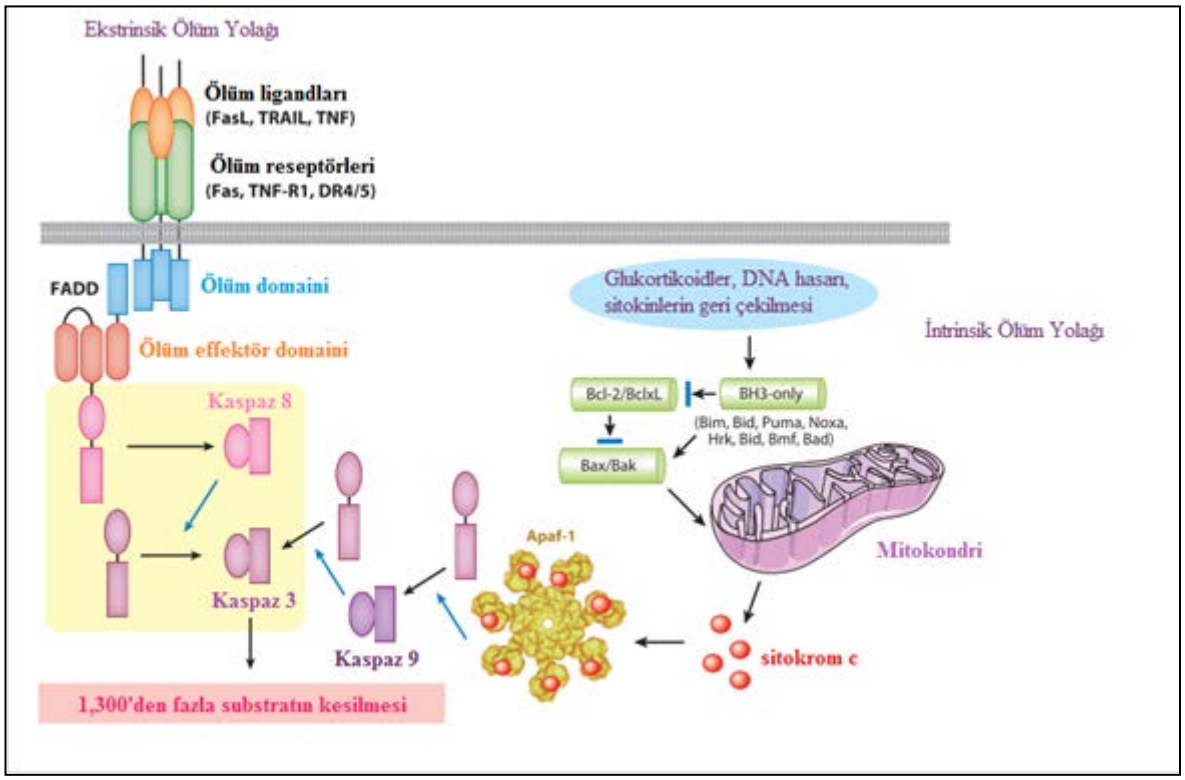
Apoptoz; sitoplazma, çekirdek ve hücre zarını ilgilendiren farklı bir grup biyokimyasal ve fiziki değişiklerle ilişikidir. Apoptozun başlarında, hücreler yuvarlanmakta, komşu hücrelerle bağlantılarını kaybetmekte ve büzülmektedir. Sitoplazmada, endoplazmik retikulum sisternalar, veziküller ve vakuolleri oluşturmak için genişlemektedir. Çekirdekte, kromatin yoğunlaşmakta ve yoğun kompakt kütlelere kümeleşmektedir ve endonükleazlar tarafından internükleozomal olarak parçalara ayrılmaktadır. Apoptotik hücrelerin DNA'sı, agaroz jel elektroforezinde merdiven basamağına benzer tipik "DNA Ladder" oluşumuyla analiz edilebilmektedir. Çekirdek de hücre gibi büzüşerek kıvrımlı hale gelmekte ve oluşan apoptotik cisimlerin kapsamında olan çeşitli parçalara ayrılmaktadır [69]. Apoptoz sırasında apoptotik hücrelerin membranlarında da değişimler olmaktadır. En belirgin değişim normalde hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde yer alan negatif yüklü

fosfotidilserin birimlerinin hücre zarının dış yüzeyine çıkmasıdır. Bunun sonucunda kollektin (C1q) adı verilen çeşitli proteinler apoptotik hücre zarına bağlanmaktadır. Ayrıca normalde hücre zarında gizlenmiş olan N-asetil glikozamin ve N, N-diasetilşitabroz molekülleri apoptozda açığa çıkmakta ve makrofajlar tarafından tanınmaktadır [70]. Hücre zarının aktif ve kıvrık olması ve son olarak yüzeyde çıkıntı halini almasıyla zarda hücre bağlantıları bozunmaktadır. Hücreler, çeşitli boyutlarda apoptotik cisimler olarak tanımlanan "paketlenmiş" hücresel içerikleri kapsayan birçok zar küresinin uzaklaşmasına neden olan gösterişli bir yolla parçalanmaktadır. Apoptotik cisimler, fagositik hücreler tarafından tanınmakta ve fagosite edilmekte, fakat enflamasyon olmamaktadır (Şekil 2.3) [69].



Şekil 2.3. Apoptoz

İntrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki apoptoz yolağı, memeli sistemlerinde tanımlanmıştır [71-73]. Her iki yolakta sinyalizasyon, ölen hücreyi parçalamak ve ortadan kaldırmak için proteolitik bir kaskatta rol oynayan kaspazlar denilen bir sistein proteaz ailesinin aktivasyonuna neden olmaktadır (Şekil 2.4) [74].

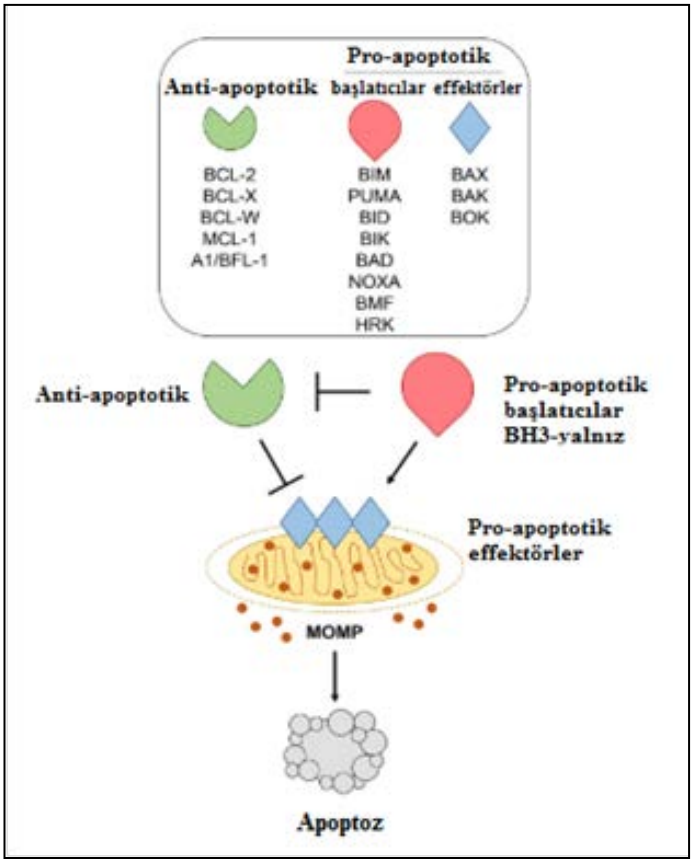


Şekil 2.4. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolakları

2.3.1. İntrinsik apoptoz yolağı

İntrinsik yolak, mitokondriyal apoptoz yolağı olarak da ifade edilmektedir, çünkü mitokondriyal intermembran alandan pro-apoptotik faktörlerin salınımını gerektirmektedir, burada kilit rol oynayan sitokrom c'dir [72]. İntrinsik yolak, gelişimsel olarak kontrol edilen ve genotoksik ajan aracılı apoptozda etkin hale gelmekte ve Bcl-2 ailesi tarafından düzenlenmektedir. Bcl-2 ailesi, üç alt aileden oluşmaktadır: pro-apoptotik yalnızca BH3 bölgesi içeren üyeler (Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf ve Bad), pro-apoptotik efektör moleküller (Bax ve Bak) ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ve Bcl-B). Sağlıklı hücrelerde Bax/Bak etkisi, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından durdurulmaktadır. Bir apoptotik uyarana yanıt olarak (gelişimsel belirti, büyüme veya sağ kalım faktörünün eksikliği veya genotoksik ajan) yalnızca BH3 bölgesi içeren üyeler, transkripsiyonel veya posttranskripsiyonel olarak yukarı doğru regüle edilmektedir. Aktif hale gelen yalnızca BH3 bölgesi içeren proteinler, Bak ve Bax üzerine etki etmekte veya anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini antagonize etmektedir [73]. Bax, bir tümör baskılayıcı gen olan p53 tarafından düzenlenmektedir. Bir kez aktif hale geldiğinde Bax ve Bak oligomerize olmakta ve bu da mitokondriyal dış membran permeabilizasyonuna (MOMP) neden olmaktadır. MOMP, intrinsik apoptoz olayını tanımlamakta ve geri dönüş noktasının

olmadığını düşündürmektedir. Permeabilizasyon; sitokrom c, ikinci mitokondri kökenli kaspaz aktivatörü SMAC ve Omi gibi intermembran proteinlerinin salınımına imkan vermektedir [75]. Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör-1) ile birlikte sitokrom c, dATP/ATP-bağımlı bir yolla bir apoptozom denilen bir kompleks oluşturmaktadır. Apoptozomun bileşiminin biyokimyasal analiziyle birlikte X-ışını yapısı, Apaf-1'in ADP ile bir kompleks halinde bir otoinhibitör formda bulunduğunu göstermiştir. Apaf-1'e sitokrom c'nin bağlanması, dATP (ATP) ile ADP'nin yerini değiştirmektedir. dATP (ATP)'ye bağlı Apaf-1, sitokrom c ile birlikte bir heptamerik kompleks oluşturmaktadır. Bu komplekse monomerik prokaspaz 9 da katılmakta ve bir dimer oluşturmaya yardım etmektedir. Sonra bu, aktif heterotetramerik bir kompleks oluşturmak için otokatalitik kesime uğramaktadır. Daha sonra aktif hale gelmiş gelmiş kaspaz 9 kesilmekte ve kaspaz 3'ü aktif hale getirmektedir. [72, 73, 76, 77]. Aktif kaspaz-3'de apoptozun gerçekleşmesi için 1300'den fazla substratın kesilmesine neden olmaktadır. Örneğin, ICAD (kaspazla aktive olan DNaz inhibitötü), apoptotik DNA fragmentasyonu için CAD'ın (kaspazla aktive olan DNaz) serbestleşmesi amacıyla, PtdSer maruziyeti için ATP11A/11C ve XKR8 ve apoptotik membran çıkıntıları için ROCK1 kesime uğramaktadır (Şekil 2.5) [73].



Şekil 2.5. Bcl-2 ailesi üyeleri [78]

2.3.2. Ekstrinsik apoptoz yolağı

Ekstrinsik yolak, hücrenin dışında hücre dışı çevredeki koşullar bir hücrenin ölmesi gerektiğine karar verdiğinde meydana gelmektedir. Tetikleyen uyaran ve katılan bileşenlerin doğasına göre apoptoz yolakları iki tip olabilmektedir, birine reseptör sistemleri katılmakta ve diğeri sitotoksik stres ile tetiklenmektedir [79]. Transmembran reseptör aracılı etkileşimler, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süperailesinin üyeleri olan ölüm reseptörlerini içermektedir. TNF reseptör ailesinin üyeleri, sisteinden zengin aynı hücre dışı bölgeleri paylaşmaktadır ve "ölüm domaini" denilen yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik bölgeye sahiptir. Bu ölüm domaini, hücre yüzeyinden hücre içi sinyalizasyon yolaklarına ölüm sinyalini iletmede kritik bir rol oynamaktadır. Bu zamana kadar en iyi tanımlanan ligandlar ve bunlara uygun ölüm reseptörleri; FasL/FasR, TNF-α/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5'dir [80]. Ölüm reseptör yolağı, FasL (CD95L olarak da bilinmekte) ve TRAIL (APO-2L olarak da bilinmekte) gibi bir ölüm ligandının sırasıyla spesifik bir transmembran ölüm reseptörü Fas (APO-1/CD95 olarak da bilinmekte) ve ölüm reseptörü 4 ve/veya 5'e (DR4, DR5) bağlanmasıyla tetiklenmektedir. Sitozolik Fas ile ilişkili ölüm domaini adaptör proteininin (FADD, MORT1 olarak da bilinmekte) ligand bağlanmış ölüm reseptörlerine bağlanmasından sonra başlatıcı prokaspaz-8 ve/veya -10, ölümü indükleyen sinyal kompleksi (*death-inducing signaling complex*: DISC) oluşumunu tamamlamak için FADD'a bağlanmaktadır. Bir kere kaspaz-8 FADD ile etkileştiğinde, yüksek kaspaz-8 lokal konsantasyonu, otoproteolitik yıkım ve aktivasyona neden olmaktadır. DISC, kaspaz-8'e homolog bir inhibitör olan c-FLIP (*Cellular FLICE-inhibitory protein*) tarafından regüle edilmektedir [81-83]. Aktif hale gelen başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazlar-3, -6 ve -7'yi kesmekte ve aktifleştirmektedir. Efektör kaspazlar bir kere aktif hale geldiğinde, sonunda hücre ölümüne neden olan geniş bir hücresel hedef spektrumunun proteolitik parçalanmasından sorumludur [84, 85]. Ek olarak kaspaz-8 ve -10, sitozolik BH3 ile etkileşen domaine sahip ölüm agonisti (Bid) proteinini de kesmektedir [86]. Oluşan C-terminal fragman t(c)Bid, mitokondriye bağlanmakta, mitokondriyal sitokrom-c'nin ve diğer pro-apoptotik mitokondriyal proteinlerin sitoplazmaya çıkışını indüklemektedir [87-89].

Apoptozun ekstrinsik yolaklardan birisi de sfingolipid aracılı regülasyonudur. Sfingolipidlerin, plazma membranındaki ilk apoptotik olaylarda önemli rolleri bulunmaktadır. Sfingomiyelinazın aktivasyonuyla sfingomiyelinden meydana gelen seramidin özellikle TNFα ve Fas ligand aracılığıyla çeşitli apoptotik uyarıları indüklediği gösterilmiştir. Seramid ve kataboliti sfingozin, hücre proliferasyonunun negatif düzenleyicileri olarak rol oynamakta ve Bid yapımını artırarak apoptozu tetiklemektedir [90, 91].

Ayrıca granzim B ile indüklenmiş hücre ölümü de, karakteristik olarak sitotoksik T lenfositler (STL'ler) ve doğal öldürücü (*Natural Killer: NK*) hücreler tarafından patojenle enfekte ve tümör hücreleri gibi zararlı hedef hücreleri yok etmek için kullanılan başlıca mekanizma olarak incelenmiştir. Granzim B ve perforin, STL'ler ve NK hücrelerinin salgı granüllerinde depolanan serin proteazlardır. Hedef hücrenin tanınmasından sonra granzim B, immünolojik sinapsa perforin gibi diğer granül proteinlerle birlikte salınmaktadır. Perforinler, hedef hücrenin membranında delikler açmaktadır. Granzim B'de kaspazların aktivasyonundan sonra DNA fragmantasyonu sonucu apoptoza sebep olmaktadır [79].

2.4. KLL

2.4.1. Sıklık

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL), Batı Dünyası'nda en yaygın görülen erişkin lösemidir; tüm lösemilerin neredeyse %25'ini ve tüm kanserlerin de %1.3'ünü oluşturmaktadır. İnsidansı, Asyalı kişilerde önemli ölçüde daha azken, Polonya ve Alman Yahudileri'nde daha fazladır [2]. Kronik lenfositik lösemi, ağırlıklı olarak yaşlı bireyleri etkilemektedir, hastaların %70'inden fazlası 65 yaş üstüdür; tanıda ortalama yaş 72'dir. Erkekler ve beyazlar, kadınlar ve diğer ırklara göre daha fazla etkilenmektedir (kadın-erkek oranı; 1,5-2,1 arasındadır) [92, 93].

2.4.2. Tanı

Kronik lenfositik lösemi (KLL); kan, kemik iliği ve sekonder lenfoid dokularda küçük, olgun neoplastik lenfositlerin birikimiyle karakterize olan ve lenfositoz, kemik iliğinde hücre infiltrasyonu, lenfadenopati ve splenomegali ile sonuçlanan $CD5^{+}$B hücrelerinin bir

malignitesidir. Etiyolojisi hala bilinmemektedir. Genetik faktörlerin, KLL'nin gelişmesinde önemli rolü olabilmektedir [5, 94]. KLL tanısı için, periferik kanda en az 5 x 10^9 B lenfosit/L (5000/µl) olması ve dolaşımdaki B lenfositlerin klonalitesinin, akım sitometriyle doğrulanması gerekmektedir. KLL'de B hücrelerin monoklonal popülasyonu; CD5, CD19, CD20 ve CD23'ü ifade etmekte ve yüzey IgM, IgD, CD20 ve CD79b'in düzeyleri, normal B hücrelerde bulunanlarla karşılaştırıldığında tipik olarak düşüktür. Lösemi hücrelerinin her bir klonu, kappa ya da lambda immünoglobulin hafif zincirlerden birini ifade etmektedir. Bu belirteçlerin ifadelenmesinin yoğunluğuna dair varyasyonlar olabilmekte ve bu durum, KLL için klinik çalışmalarda bir hastanın dahil edilmesine engel olmamaktadır [94].

2.4.3. Klinik seyir ve prognostik faktörler

KLL'li hastalarının çoğunluğu asemptomatik olup, uzun yıllar boyunca herhangi bir tedaviye ihtiyaç duymayabilmektedir. Bununla birlikte bazı hastalarda, daha agresif bir klinik seyir ve daha kısa sağ kalım görülmektedir [95]. Sessiz hastalığı olan yaşlı hastalarda sağ kalım, çoğunlukla KLL dışı nedenlere bağlıdır. Oysa ileri evre ya da hızla ilerleme bulguları var olan genç hastalarda beklenen sağkalım süresi küratif tedavi yaklaşımı olmaması nedeniyle oldukça kısadır. Tanı anında ortanca yaşam süresi 1 yıl ile 10 yıldan uzun süre arasında değişkenlik göstermekle birlikte, olguların büyük çoğunluğunda bu süre 7.5 ile 10 yıl arasında değişmektedir [96].

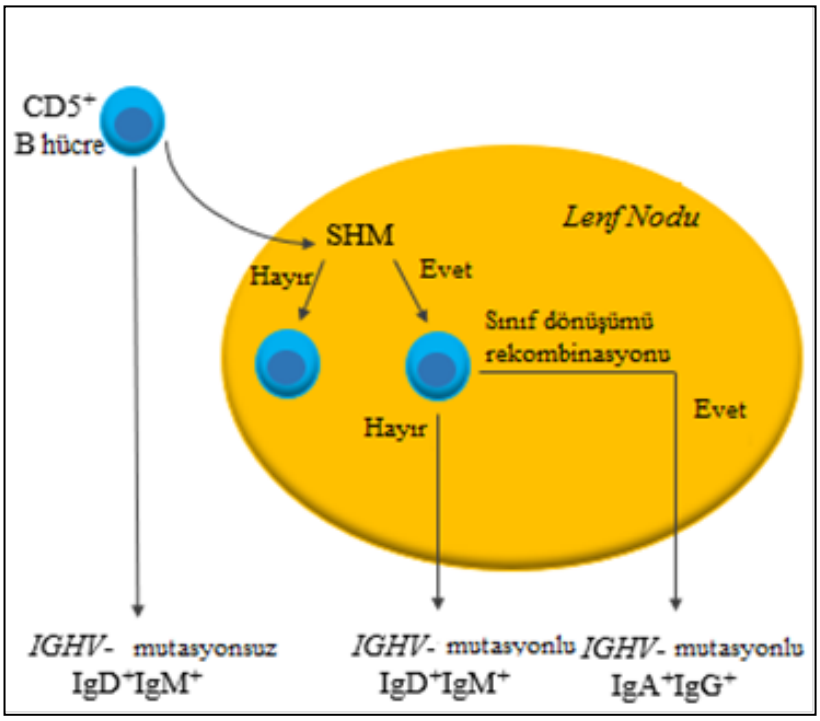
İmmünoglobulin ağır zincir değişken gen bölgesi (IGHV) mutasyon durumu, CD38, CD49d ve ZAP-70 aşırı ifadelenmesinin biyolojik önemiyle ilişkili yapılan çeşitli çalışmalar, hastalığın ilerlemesi ve sağ kalım açısından hastaların tanımlanmasına imkan sağlamıştır [97-100]. Bununla birlikte, bu lösemik hücreler tarafından kullanılan B hücre antijen reseptörünün yapısı ve fonksiyonuna dair çalışmalar, bu hastalığın biyolojisinin tanımlanmasına yardımcı olmuştur [101-103].

ZAP70, T ve NK hücrelerindeki en önemli sinyalizasyon molekülüdür ve dalak tirozin kinaza (*spleen tyrosine kinase*: SYK) yapısal olarak homologtur. ZAP70, B hücre reseptörlerinin sinyalizasyonunu arttırmaktadır ve yüksek düzeylerde ZAP70 ifade eden hücrelere sahip hastalarda daha agresif bir hastalık seyri görülmektedir [104, 105].

Yüksek CD38 ifadelenmesi olan hastalar da hastalığın daha hızlı ilerlediği ve daha kısa bir yaşam süresi görülmüştür [106]. CD38, KLL mikroçevresinin hücreleri tarafından ifade edilen bir hücre adezyon molekülü olan CD31'in bağlanmasıyla B hücre etkileşimleri ve farklılaşmasını destekleyen bir yüzey molekülüdür [107, 108]. CD38'ün, adenozin difosfat-riboz siklaz aktivitesi bulunmaktadır ve belli koşullar altında B hücre reseptörlerinin sinyalizasyonunu arttırmakta ve B hücrelerinin apoptozunu düzenleyen sinyalleri doğurmaktadır [108, 109].

CD49d; α4β1 integrin, CD49d/CD29 veya çok geç antijen 4 (*very late antigen 4*: VLA-4) olarak da bilinmektedir. CD49d'nin ifadelenmesi, KLL lösemik hücrelerinin mikroçevre ile aracılı proliferasyonunu arttırmaktadır. CD49d proteininin yüksek düzeyleri, hastalığın daha hızlı ilerlemesi ve daha kısa bir sağ kalım ile ilişkili bulunmuştur [110, 111].

IGHV gen mutasyonları analizleri, somatik mutasyonlu ve somatik mutasyonsuz olmak üzere KLL'nin iki farklı kategorisini ortaya çıkarmıştır [97, 106, 112]. Bu çalışmalarda, birçok benzer germ hattı geninden >%2'lik farklılıkları olan IGHV gen dizileri, "mutasyona uğramış" olarak düşünülmektedir. Germ hattı geninden <%2 farlıklılık gösteren IGHV gen dizileri ise "mutasyona uğramamış" olarak düşünülmektedir [112]. Mutasyona uğramamış bir *IGVH*'ı ifade eden KLL hücreleri, bir immün yanıt boyunca B hücrelerinin immunoglobulin değişken bölgelerinde somatik hipermutasyonun ve seleksiyonun meydana geldiği yer olan germinal merkezlerde diferansiasyona uğramamış bir B hücresinden köken almaktadır. Mutasyona uğramış *IGVH*'ı olan KLL hücreleri, antijene karşı bir immun yanıt boyunca normal B hücrelerinde olana benzer şekilde somatik hipermutasyona ve bazı durumlarda da immunoglobulin izotip değişimine uğramış immünoglobulini ifade eden post-germinal merkez B hücresinden meydana gelmektedir [113]. KLL'yi karakterize etmek için hücre yüzey immünoglobulinlerini bilmek de önemlidir, çünkü anormal B hücrelerinin kökeni hakkında bilgi vermektedir. IgM ve IgD, başlıca *IGH*V-mutasyona uğramamış B hücrelerinde bulunmaktayken IgA ve IgG, sınıf dönüşüm rekombinasyonu geçiren daha olgun hücreler olan *IGH*V-mutasyona uğramış B hücrelerinin özelliğidir [114] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. B-KLL hücrelerinin kökenleri [5]

Somatik mutasyonların, IGHV gen alt grupları arasında eşit oranda oluştuğu gözükmemektedir, daha ziyade bir mutasyon hiyerarşisi görülmektedir (IgHV3> IgHV4> IgHV1). Tek tek IgHV genleri göz önünde tutulduğunda farklılıklar çok daha çarpıcı olmaktadır. IgHV1-9, çok az mutasyon taşımaktayken, tersine IgHV3-07, IgHV3-23 ve IgHV4-34 yüksek bir mutasyon yükü göstermektedir. Bu farklılıklar; KLL öncüllerinin, lösemik dönüşümden önce farklı antijen tipleri tarafından farklı uyarılar aldığını ve öncüllerin lösemik hücrelere olgunlaşmanın farklı evrelerinde dönüştüğünün belirtisi olabilmektedir [112]. Yapılan çeşitli çalışmalar, mutasyona uğramış IGHV geni taşıyan hücrelere sahip KLL hastalarının kemoimmünoterapiye daha iyi yanıt verdiğini, oysaki mutasyona uğramamış IGHV geni taşıyan hücrelere sahip KLL hastalarının tedavi için daha kısa süreleri, daha fazla kemoterapiye direnç ve daha az sağ kalım oranına sahip olduklarını göstermiştir [106, 115, 116].

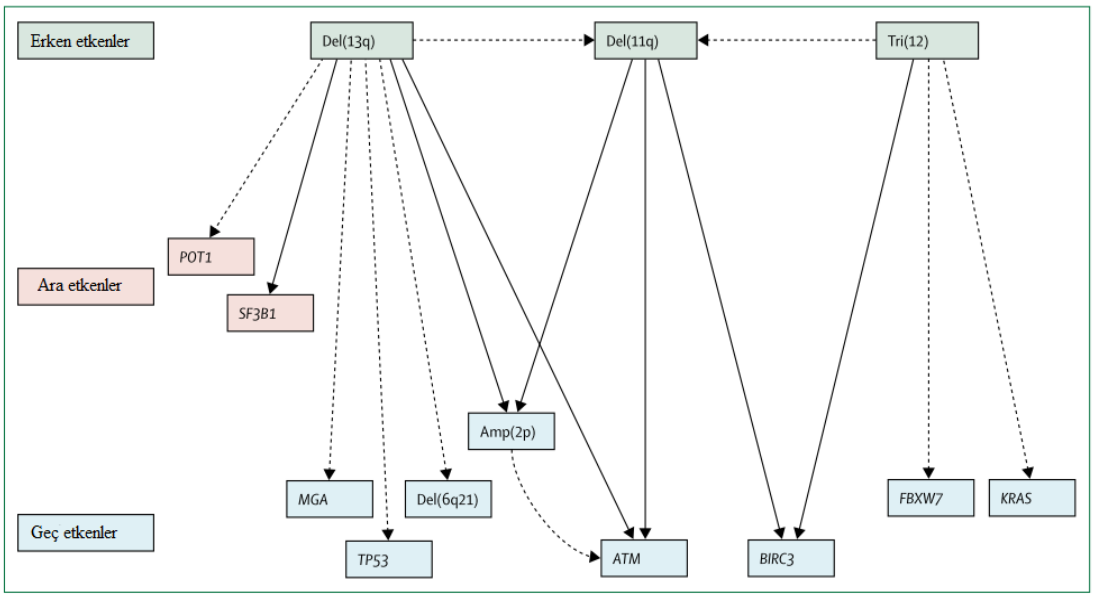
B hücre reseptörü; bir ligand bağımlı transmembran immünoglobulin molekülü (IgA, IgD, IgE, IgG veya IgM'den biri) ve Igα (CD79A olarak da bilinmektedir) – Igβ (CD79B olarak da bilinmektedir) sinyalizasyon heterodimerinden oluşmaktadır. Normal B hücreleriyle karşılaştırıldığında düşük düzeylerde olmakla beraber KLL hücreleri, IgD ve IgM'yi birlikte ifade etmektedirler; KLL vakalarının çok az bir yüzdesi, en yaygın IgG olmak üzere sınıf dönüşümlü izotipleri ifade etmektedir. CD79A ve CD79B molekülleri,

immünoreseptör tirozin temelli aktivasyon motiflerini içermektedir, bunlar yüzey immünoglobulinin çapraz bağlanmasını takiben fosforillenebilmekte ve böylelikle B hücre reseptörü (BHR) sinyalizasyonu tetiklenmektedir. Fonksiyonel bir BHR, olgun B hücrelerinin sağ kalımı için gereklidir ve KLL gibi birçok olgun B hücre malignitesinde korunmaktadır [5]. KLL'ye dair kanıtlar, in vivo olarak B KLL hücrelerinin yüzey immünoglobulinlerinin otoantijen ile bağlandığı, bununda yapısal BHR sinyalizasyonuna neden olduğunu göstermektedir [117, 118]. Bu etkileşimin önemi, diğer reseptörlerdeki etkilerin bir rolü olmakla beraber, BHR sinyalizasyonunu bloke eden kinaz inhibitörlerinin klinik başarısıyla vurgulanmaktadır [119]. Birçok kanser gibi KLL ve BHR sinyalizasyonunun sonucu, artmış B hücre aktivasyonu ile B hücre anerjisi arasında değişmektedir. Anerjiye neden olan BHR sinyalizasyonu, çok da iyi tanımlanamamıştır, fakat genel anlamda B hücre aktivasyonuyla ilişkili olan yolakların yalnızca kısmi aktivasyonuyla birlikte inhibitör moleküllerin çapraz aktivasyonuna yol açtığı gözükmektedir [120] BHR sinyalizasyonuna katılabilen önemli bir molekül, inozitol lipid fosfataz SHIP1'dir. SHIP1, tirozin-protein kinaz LYN tarafından aktif hale gelmektedir ve hem devamlı olarak bağlanan reseptörlerde ve hem de uzaktaki bağlanmamış BHR'lerde, fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K) aktivitesini engellemesiyle B hücre aktivasyonunu kısıtlayabilmektedir, böylece bunları uyarıya karşı duyarsız hale getirmektedir [121, 122]. Artmış B hücre aktivasyonu, mutasyonsuz *IGVH*'ı ifade eden KLL'de daha yaygın gözlenmektedir, oysaki anerji, mutasyonlu *IGVH*'ı ifade eden KLL vakasında daha fazladır [123]. Hücrelerin kaderi (anerjiye karşılık aktivasyon), KLL hücrelerini oluşturabilen hücre tiplerinin DNA metilasyon paternlerinin farklılık gösterdiği ve muhtemelen otoantijenlere farklı olarak yanıt verdikleri için KLL hücresinin kökeninden etkilenebilmektedir [124]. Bunların dışında BHR; α4β1 integrin gibi integrinleri içeren başka hücre yüzey reseptörlerinin aktivitesini koordine etmektedir. BHR stimülasyonu, KLL hücrelerinin fibronektin ve vasküler hücre adezyon proteini 1 gibi α4β1 integrin substratlarına adezyonunu arttırabilmektedir [125]. Buna karşılık CXC-kemokin reseptörü (CXCR4), BHR angajmanı (ligandlara kilitlenmesi) ile azalarak düzenlenmektedir ve her ikisi "içten-dışa" sinyalizasyonu tetikleyebilmektedir, bu da α4β1 integrin'in aktivasyonuna neden olmaktadır. Böylelikle, lenfoid dokuda karşılaşılan tanınmış antijen, muhtemelen KLL hücrelerinin adezyonunu ve göçünü etkilemektedir [126, 127].

Lenfosit sayısının iki katına çıkma zamanı, β_2 mikroglobulin ve çözünebilir CD23 düzeyleri, serum timidin kinaz düzeyleri, kemik iliği histolojisi ve sitogenetik

anormallikler de (FISH ile belirlenebilen 17p ya da 11q delesyonları) KLL'deki diğer prognostik parametrelerdir [4, 106, 128].

Kronik lenfositik löseminin kapsamlı genomik analizleri, birçok hastadaki lösemik dönüşümün kromozomal materyalin kaybı veya kazanımıyla başladığını göstermişlerdir. Hastalığın seyri boyunca kazanılan ek mutasyonlar veya kromozom değişimleri, bu löseminin daha agresif ve tedaviye dirençli olmasına neden olmaktadır (Şekil 2.6). Kromozomal bozuklukların başında; vakaların yaklaşık %55'inde görülen kromozom 13q'nun delesyonu (del[13q]) ve vakaların %10-20'sinde görülen kromozom 12'nin kazanımı (trizomi 12) bulunmaktadır. Kromozom 11q'nun delesyonu, vakaların yaklaşık %10'unda ve kromozom 17p'nin delesyonu ise vakaların %5-8'inde görülmektedir, fakat bu anomaliler çoğunlukla hastalığın geç evrelerinde kazanılmaktadır. Del(13q), lökomogenezi başlatan miRNA'ların (miR-15a ve miR-16-1) kaybına neden olmaktadır. Del(11q) ise, bir DNA hasarına yanıt kinazı ATM'yi kodlayan ATM geninin kaybına neden olmaktadır. Del(17p), tipik olarak tümör baskılayıcı gen TP53'ü silmektedir. Ayrıca NOTCH1, XPO1, KLHL6, MYD88 ve SF3B1 gibi somatik gen mutasyonları da tanımlanmıştır. Kronik lenfositik lösemi hücrelerinin sağ kalımı, hücresel bileşenlerin mikroçevresine de bağlıdır. Makrofajlar, T hücreleri veya stromal foliküler dendritik hücreler; kemokinler, sitokinler veya anjiojenik faktörler tarafından veya farklı yüzey reseptörleri veya adezyon moleküleri tarafından lösemik hücrelerdeki çok önemli sağ kalım ve ön proliferatif sinyalizasyon yolaklarını uyarmaktadır [128] (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Kronik lenfositik löseminin genetik etkenleri [128]

2.4.4. Evreleme

Kronik lenfositik lösemi için klinik evreleme sistemleri Rai ve Binet tarafından geliştirilmiş ve son 40 yıldır klinik pratik ve çalışmalarda prognoz için temel oluşturmuştur. Bu evreleme sistemleri, fiziksel muayene ve standart laboratuvar testlerine dayanmakta ve görüntüleme çalışmalarını içermemektedir [6, 7] (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. KLL evreleme sistemleri [129]

EVRE	TANIM	ORTALAMA SAĞ KALIM
Binet sistemi		
Binet A	Hb ≥10.0 g/dL Trombositler ≥100x10^9/L <3 lenf nodu bölgeleri	>10 yıl
Binet B	Hb ≥10.0 g/dL Trombositler ≥100x10^9/L ≥3 lenf nodu bölgeleri	>8 yıl
Binet C	Hb < 10.0 g/dL Trombositler <100x10^9/L	6,5 yıl
Rai sistemi		
Düşük risk		
Rai 0	Lenfositoz >15x10^9/L	>10 yıl
Orta risk		
Rai I	Lenfositoz ve lenfadenopati	>8 yıl
Rai II	Lenfoadenopati ile birlikte/lenfoadenopati olmadan, lenfositoz ve hepatomegali ve/veya splenomegali	
Yüksek risk		
Rai III	Lenfoadenopati/organomegali ile birlikte veya olmadan, lenfositoz ve Hb <11,0 g/dL	6,5 yıl
Rai IV	Lenfoadenopati/organomegali ile birlikte veya olmadan, lenfositoz ve trombositler <100x10^9/L	

2.4.5. KLL için apoptoz temelli stratejiler

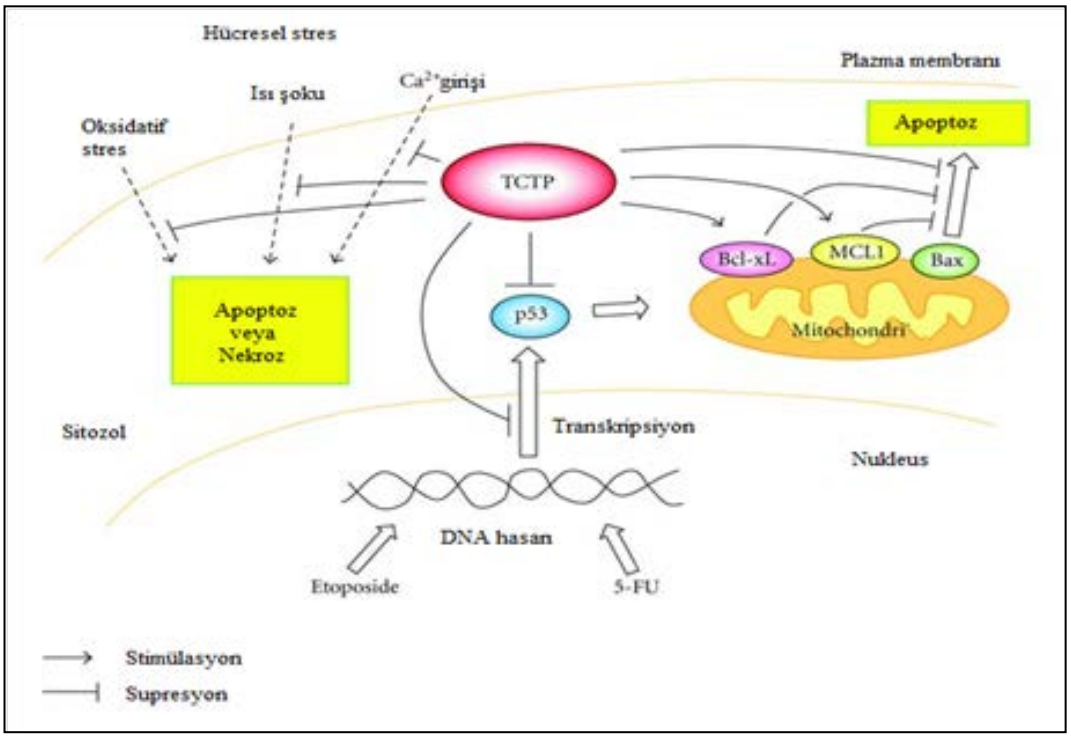
KLL hücrelerindeki apoptotik mekanizmayı aktive eden çeşitli yollar, son 15 yıl boyunca kapsamlı olarak geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlar; NF-kB veya PI3K/AKT yolaklarının inhibisyonu, p53-bağımlı apoptozun artırılması, ölüm reseptörleri aracılığıyla ekstrinsik yolağın uyarımı, BHR sinyalizasyonuyla veya lösemik mikroçevre tarafından gönderilen sağ kalım sinyalleriyle karşılıklı etkileşim, yeni kemoterapötikler (örneğin, bendamustin, forodesin, acadesin) ve monoklonal antikorları kapsamaktadır. Bununla birlikte, en geniş kapsamlı çalışılan yaklaşım, apoptozun intrinsik mitokondriyal yolağını direk olarak tetikleyebilen ajanların tanımlanması olmuştur [9].

Anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin BCL-2 (B hücreli lenfoma-2) ailesi, KLL'de apoptoz kontrolü açısından önemlidir ve Bcl-2, KLL'de sağ kalımı öngörmede yardımcı

olan başlıca protein olarak iddia edilmektedir [130]. Özellikle anti-apoptotik BCL-2 ailesi proteinleri (Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-w), BH1-4 bölgeleri denilen dört ardışık motifi paylaşmakta ve pro-apoptotik BCL-2 ailesi üyeleriyle etkileşerek mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu önlemektedir. Pro-apoptotik proteinler ise yapılarına göre iki alt gruba ayrılmaktadır; ilki üç BH3 bölgesi taşımakta ve "multidomain" olarak adlandırılmakta (bok, bax ve bak) ve ikincisi ise yalnızca tek bir BH3 bölgesi içermekte ve bu yüzden "BH3-only" proteinleri denilmektedir (Bim, Bid, Bad, Noxa ve Puma). Bax ve Bak aktivasyonu, porların oluşmasına ve mitokondriyal dış membran permeabilizasyonuna neden olmaktadır, bu apoptotik ölümde geri dönüşün olmadığı noktadır. BH3-only proteinleri, Bak/Bax'ın direkt aktivatörleri olarak veya daha sıklıkla, Bak/Bax'ın anti-apoptotik proteinlerden ayrılmalarına yol açarak duyarlaştırıcılar olarak rol oynayabilmektedir. Anti-apoptotik aile üyeleri, pro-apoptotik aile proteinlerinin BH3 bölgelerine bağlanmakta ve Bak/Bax homo-oligomerizasyonunu ve BH3-only protein aktivasyonunu önlemektedir [131]. Birçok çalışma KLL'de pro- ve anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyeleri arasındaki dengenin kemoterapiye duyarlılığı ve hastaların sağ kalımını etkilediğini göstermiştir; ayrıca pro- ve anti-apoptotik proteinlerin arasındaki bu dengenin her bir proteinin tek başına ifadelenmesinin yoğunluğundan daha önemli olduğu bulunmuştur [132]. Bununla birlikte bazı araştırmacılar tarafından Bax ve Bcl-2 oranının, KLL'de apoptozun başlıca belirleyici faktörü olduğu belirtilmektedir [133]. Birçok kronik lenfositik lösemide (KLL), yüksek Bcl-2 düzeyleri bulunmaktadır, bunun da KLL hastalarının %50'den fazlasında karakteristik olarak silinmiş bir bölge olan 13. kromozomun uzun kolunda bulunan mikroRNA'lar miR-15 ve miR-16'nın eksikliğiyle post-transkripsiyonel düzenlemeleri veya Bcl-2 geninin hipometilasyonunu kapsayan epigenetik mekanizmalarla açıklandığı gözükmektedir [134, 135]. Bununla birlikte artmış Mcl-1 protein ifadelenmesi, B KLL hücrelerinin neredeyse yarısında meydana gelmekte ve stromayla lösemik hücrelerin birlikte kültüre edilmesinden sonra bu yukarı regülasyon, fludarabin direnciyle ilişkilendirilmektedir [136, 137].

TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*=Translasyonel olarak kontrol edilen tümör proteini), translasyonel olarak regüle edilen genlerle ilgilenen gruplar tarafından ilk olarak yaklaşık 20 yıl önce keşfedilmiştir. Bu protein ilk önce P21, Q23 ve P23 olarak adlandırılmıştır [138]. Histamin salgılama faktörü (HRF) yada fortilin olarak da adlandırılan TCTP, ökaryotik organizmalarda bulunan evrimsel olarak çok iyi korunmuş 172 aminoasitlik bir proteindir. HRF olarak adlandırılmasının nedeni, IgE-bağımlı bir

şekilde bazofillerden histamin salınmasına neden olmasıdır [139, 140]. Sitoplazma ve nukleusta bulunan bu protein, çeşitli dokularda ifadelenmekte ve çok çeşitli hücre dışı uyaranlara yanıt olarak regüle edilmektedir. Yapılan çalışmalar, TCTP'nin gelişim, hücre büyümesi, hücre iskeleti, protein sentezi, immün yanıt, tümör geri dönüşümü, malign dönüşüm ve pluripotent kök hücrelerin indüksiyonu veya apoptoz gibi birçok biyolojik sürece katıldığını göstermiştir [141, 142]. TCTP; ateroskleroz gelişimini kolaylaştırmakta, hem sistemik hem de pulmoner arteriyel hipertansiyona katkısı olmakta ve diyabetik nefropatiyi de kötüleştirmektedir [143]. Ayrıca TCTP, yeni bir anti-apoptotik protein olarak belirtilmekte ve meme, mide, kolorektal, hepatosellüler, akciğer, oral skuamöz hücre, over, prostat kanseri ve sinir sisteminin maligniteleri gibi çeşitli malignitelerde aşırı ifadelenmektedir [18, 19, 143]. TCTP; oksidatif stres, ısı şok veya Ca^{+2} girişiyle indüklenen hücre ölümünü inhibe etmektedir. Ek olarak TCTP, etopozid ve 5-florourasil gibi genotoksik ajanlarla tedavi sonucu tetiklenen apoptozdan da hücreleri koruyabilmektedir (Şekil 2.8) [144].

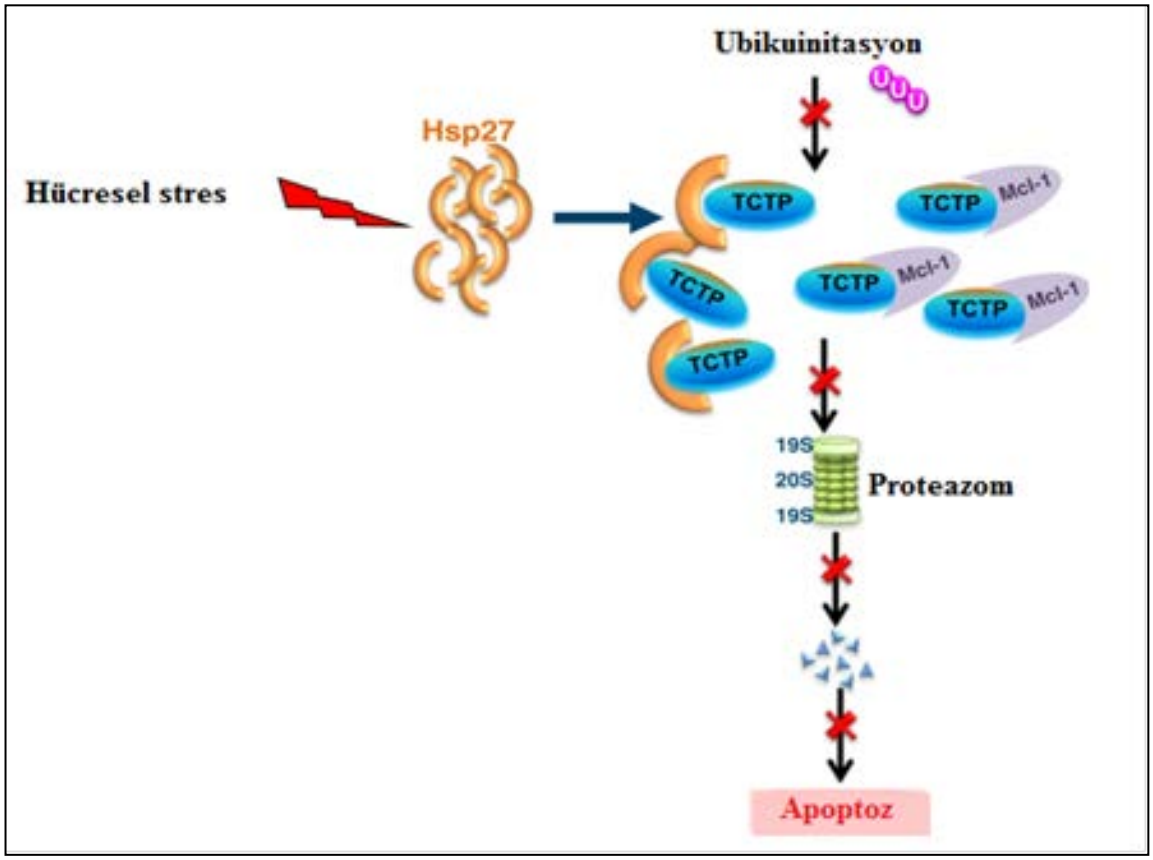


Şekil 2.8. TCTP ve apoptoz

TCTP proteini regülasyonu, açık bir şekilde anlaşılamamıştır. Bunun için yapılan çalışmalarda BCL-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri Mcl-1 ve Bcl-xL ile TCTP arasında bir etkileşim olduğu ifade edilmektedir [145]. Mcl-1'in TCTP mRNA miktarını değiştirmeden TCTP proteinini stabilize ettiği ve degradasyona daha az duyarlı hale

geldiği gösterilmiştir. Ayrıca, Hsp27'nin TCTP ile direk olarak etkileştiği ve ubikuitin-proteazom yolağından korunmasını sağladığı da bulunmuştur [146, 147] (Şekil 2.9). Bununla birlikte KLL hastalarının kan örnekleriyle yapılan bir çalışmada da TCTP ve Mcl-1, KLL hastalarında sağlıklı bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır [148]. Ayrıca TCTP'nin, mitokondriyal membranda dimerize olarak MAK (mitokondriyal apoptozla indüklenmiş kanal) por oluşumuna katkıda bulunan pro-apoptotik protein Bax'ı inhibe ettiği bulunmuştur [149]. Bunların dışında TCTP, Ca^{+2}'ye bağlanmakta ve hücre içinde onu tutmakta ve hücreleri Ca^{+2}'ya bağlı apoptozdan korumaktadır [150].

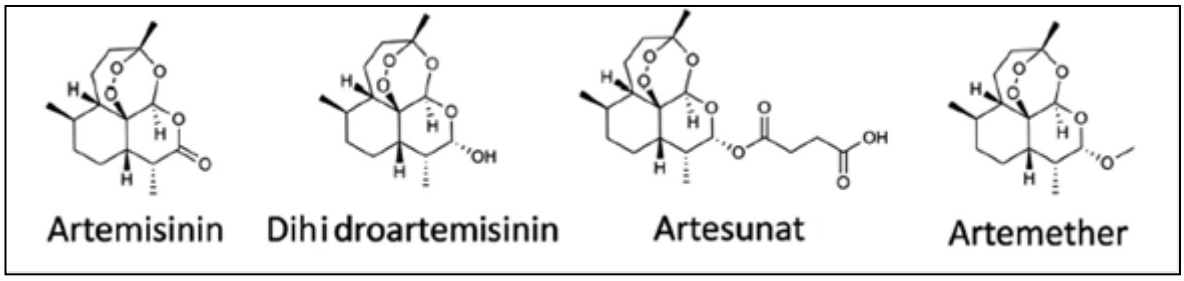
p53, TP53 adı verilen bir gen tarafından kodlanan özellikle DNA hasarı sonucu oluşan hücresel yanıtı kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. DNA hasarı düzeltilene kadar hücre siklusunun durmasına, eğer ki hasar tamir edilemezse hücrenin apoptoza geçiş yapmasına neden olmaktadır [151]. TCTP, tümör baskılayıcı protein p53'e bağlanmaktadır [152]. Bağlanma hem p53'ün stabilizasyonunu bozmakta ve Bax gibi transkripsiyonel olarak aktive olan pro-apoptotik moleküllerden p53'ü korumaktadır [153].



Şekil 2.9. TCTP protein stabilitesinin regülasyonu: Hsp27 ve Mcl-1'in, TCTP'yi degradasyona karşı koruması ve apoptozu önlemesi [18]

2.5. Dihidroartemisinin

Qinghaosu olarak da adlandırılan Artemisinin (ARS), geleneksel Çin tıbbında Plasmodium falciparum nedeniyle sıtmaya karşı kullanılan ve tatlı pelin olarak da bilinen Artemisia annua L. bitkisinden elde edilen bir bir seskiterpen laktondur [154]. Dihidroartemisinin (DHA), artesunat (ART) ve artemether (ARM) gibi artemisinin türevlerinden biridir ve yıllardır klinikte kullanılmaktadır (Şekil 2.10) [155-157].



Şekil 2.10. Anti-kanser aktiviteli artemisinin ve türevlerinin kimyasal yapıları [158]

İlginç bir şekilde artemisinin ve türvelerinin anti-malaryal özelliğine ek olarak kansere karşı etkileri de bulunmaktadır [158]. Farklı artemisinin türevi bileşikleri, sitotoksik kapasiteleri bulunmak için çalışılmış ve hepsi antineoplastik aktivite göstermiş olmalarına rağmen, en güçlü bileşiğin dihidroartemisinin olduğu gözükmektedir [159]. Dihidroartemisinin; gliyoma, meme, kolon, akciğer, karaciğer, mide, pankreas, prostat, over, serviks kanseri, lösemi gibi çeşitli kanser hücrelerinde anti-kanser etkiler göstermiştir [11, 160-169]. Anti-tümör aktivitelerine dair etki mekanizmaları tam anlaşılamamakla beraber kanser hücrelerinin seçici sitotoksisitesi, apoptozun indüksiyonu, gen ifadelenmesinin modülasyonu, hücre siklusunun durması ve anjiyogenezin inhibisyonunu içermektedir. Farklı yolaklarla kompleks bir etkileşim ağı, kanserin kontrolü ve hücre ölümüne neden olan bu endoperoksit ilaçların anti-kanser etkisini arttırabilmektedir (Şekil 2.11) [170].

Artemisininler, anti-kanser fonnksiyonlarını ortaya çıkarmak için hücresel membrandan geçebilen hidrofobik moleküllerdir. Anti-malaryal stratejide olduğu gibi artemisininler, hücresel hasarı indüklemek için yapısında bulunan endoperoksit bileşen, süperoksit anyon ve hidroksil radikalleri gibi ROT (reaktif oksijen türleri) oluşumu aracılığıyla etki etmektedir [171]. Normal hücrelerle karşılaştırıldığında kanser hücrelerinin, inaktif nükleik asit metabolizmasına katılan çok sayıda demire ihtiyacı vardır ve bu yüzden tümör

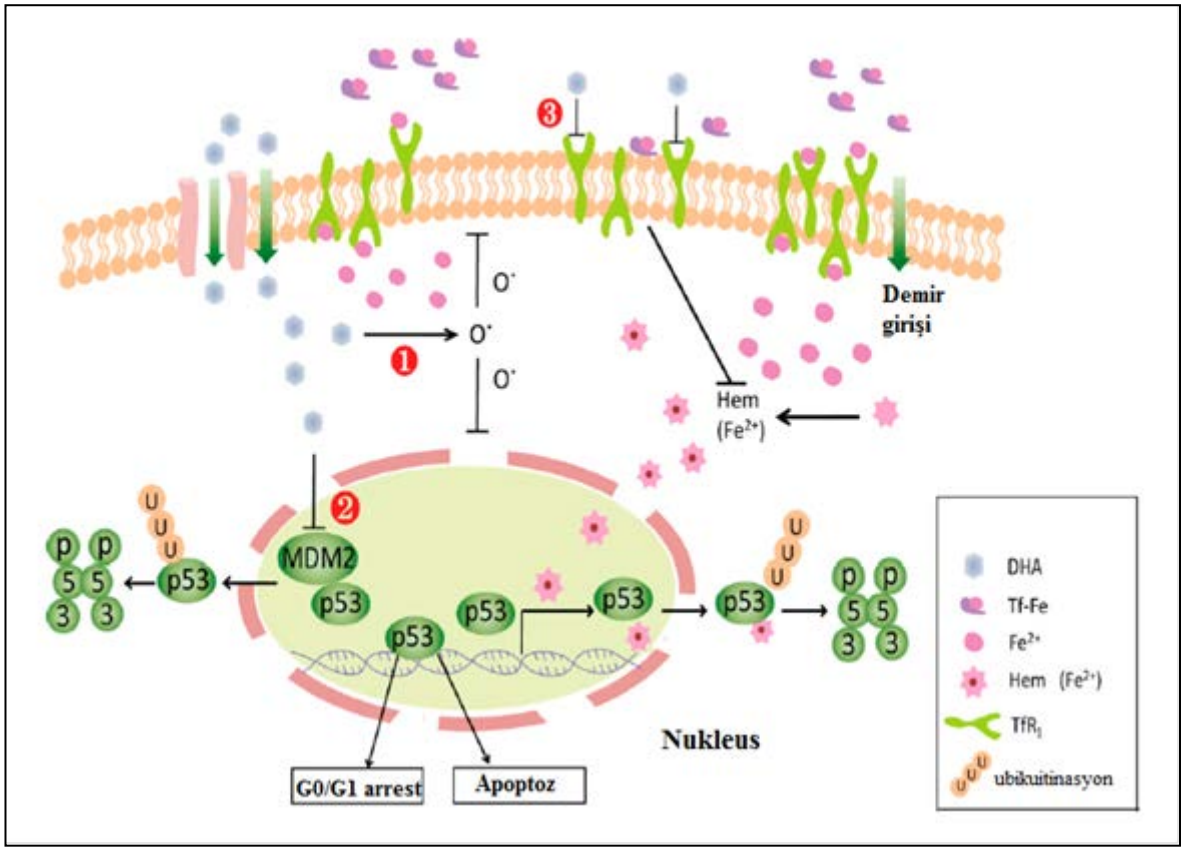
hücrelerinin çoğunun yüzeyinde, yüksek yoğunlukta transferrin reseptörü (TfR) bulunmaktadır. Serbest demir varlığında artemisininler, kanser hücrelerine oksidatif hasarı direk indükleyebilmek için çok güçlü bir alkilleyici ajan olan sitotoksik karbon merkezli bir radikale kendilerini dönüştürebilmektedir [171]. Son zamanlarda, aşırı hem demirinin, tümör baskılayıcı p53 proteinine bağlanabildiğini ve p53'ün nukleustan sitoplazmaya taşınması ve sitozolik degradasyonunu tetiklediğine dair yeni bir mekanizma tanımlanmıştır [172]. Dihidroartemisinin, hücre yüzey transferrin reseptörü düzeylerini aşağı regüle ederek ve nükleer protein MDM2'ye (Murine Double Minute-2) bağlanarak p53'ün ubikuitinasyonunu inhibe eden "çift-fonksiyonlu" bir bileşiktir [173].

ARS türevleri, hücre siklusunun herhangi bir evresini etkileyerek tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebilmekte ve etki mekanizması, hücre siklusundaki regülatör enzimlerin ifadelenmesini ve aktivitesini değiştirerek meydana gelmektedir. Normal hücrelerde siklin bağımlı kinazlar (CDK), hücrenin hücre döngüsünden geçmesi için sinyalleri ileten proteinlerdir. Dihidroartemisinin ile indüklenmiş G0/G1 fazında hücre siklusunun durması, CDK promoterının aktivitesinin inhibe olması veya CDK inhibitörlerinin aktivitesi sayesinde siklin bağımlı kinazların transkripsiyonel aktivitesi ve siklinlerin aşağı regülasyonu ile meydana gelebilmektedir [170, 171].

Oksidatif stres ve DNA hasarı, hücre siklusunun ilerlemesini bloke etmenin yanı sıra apoptozu da indüklemektedir. ARS bileşikleri, genel olarak mitokondri aracılı yolaklarla apoptozu indüklemektedir [15, 174, 175]. Dihidroartemisinin'in, Fas'ı arttırıp kaspaz-8'i aktive ederken pro-apoptotik protein Bax'ı etkili bir şekilde arttırdığı ve anti-apoptotik protein Bcl-2'yi aşağı regüle ettiği, bunun yanı sıra nükleer faktör-kappa B'nin (NF-κB) translokasyonunu ve DNA'ya bağlanma aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir [176-178].

Yukarıda açıklanan etki şekillerine ek olarak ARS ve türevi ilaçlar, tümör anjiyogenezini inhibe etmektedir. Etki mekanizmalarına anjiyogenezin katılımının kanıtlamak için kan damarı endotelyal hücreleri (HUVEC), koriyoallantoyik membran tayini veya çıplak farelerde insan ksenograft tümörleri gibi farklı modeller kullanılmıştır [179]. Tümör hücrelerinden anjiyojenik faktörlerin (VEGF, KDR/flk-1, VEGFR2) salgılanması, ARS ve türevlerinin tedavisiyle inhibe edilmektedir. Böylelikle yeni anjiyogenez bloke olabilmekte ve tümör hücrelerinin proliferasyonu ve metastazı inhibe olabilmektedir [180].

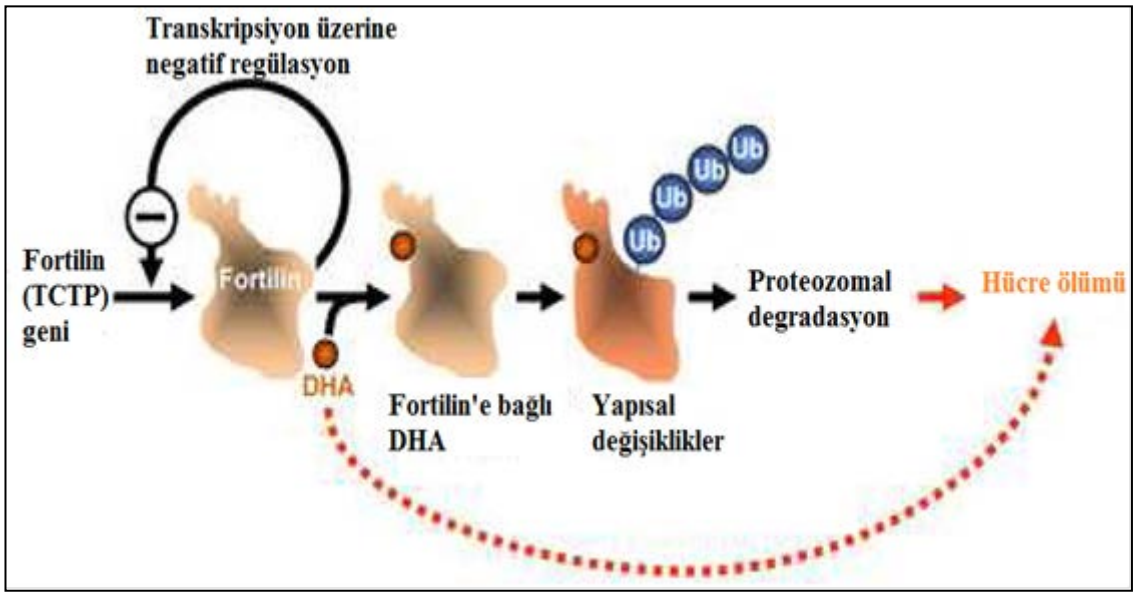
Yapılan çeşitli çalışmalarda, artemisinin ve türevlerinin otofajiyi indüklediği ve otofazogom belirteçlerinin oluştuğu bulunmuştur [181-185]. Otofaji, hücrelerin besinlerden mahrumiyet gibi stresli durumlara adapte olabilmesi için evrimsel olarak korunmuş yıkıma neden olan bir süreçtir. Otofaji sürecinde, hasar görmüş veya gereksiz sitoplazmik içerikler otofajinin erken evreleri boyunca otofagozomlar olarak bilinen çift membranlı özelleşmiş yapılarda tutulmaktadır. Olgun otofagozomlar, otolizozomları oluşturmak için otofajinin geç evreleri boyunca lizozomlarla birleşmekte ve taşıdıkları içeriklerini parçalara ayırmakta ve yapıtaşı olan bileşikler yeniden dolaşıma girmektedir [186].



Şekil 2.11. DHA'nın tümör hücreleri üzerine etki yolakları [170]

ARS ve türevleri, kanser hücrelerinde çeşitli önemli sinyalizasyon yollarını etkilemektedir. Bileşenler, β-katenin'in aşağı regülasyonu ve β-katenin'in nukleustan hücre membranına translokasyonu ile Wnt/ β-katenin yolağını inhibe etmektedir [162, 187, 188]. Bununla birlikte ARS ve türevleri, BCR/ABL sinyalizasyonunun yanında epidermal büyüme faktörü reseptörünü inhibe etmektedir [189, 190]. mTOR, MYC/MAX, NF-κB, CREB gibi kanserle ilişkili transkripsiyon faktörlerini de inhibe etmektedir [191-194].

DHA, hemin varlığında TCTP'ye kovalent olarak bağlanmakta, TCTP'nin ubikuitinlenmesini arttırıp proteazoma bağlı bir şekilde TCTP'nin yarı ömrünü kısaltmakta ve çeşitli hücrelerde TCTP'nin hücresel düzeylerini azaltmaktadır [22, 143, 195]. DHA'nın TCTP'nin fosforillenmiş formunu da hedef alarak hücre proliferasyonunu azalttığı ve apoptotik hücre ölümünü indüklediği bildirilmiştir [196]. DHA'nın, safra kesesi kanserinde TCTP-bağımlı hücre migrasyonu ve invazyonunu inhibe ettiği ve metastazı azaltığı da bulunmuştur (Şekil 2.12) [197].

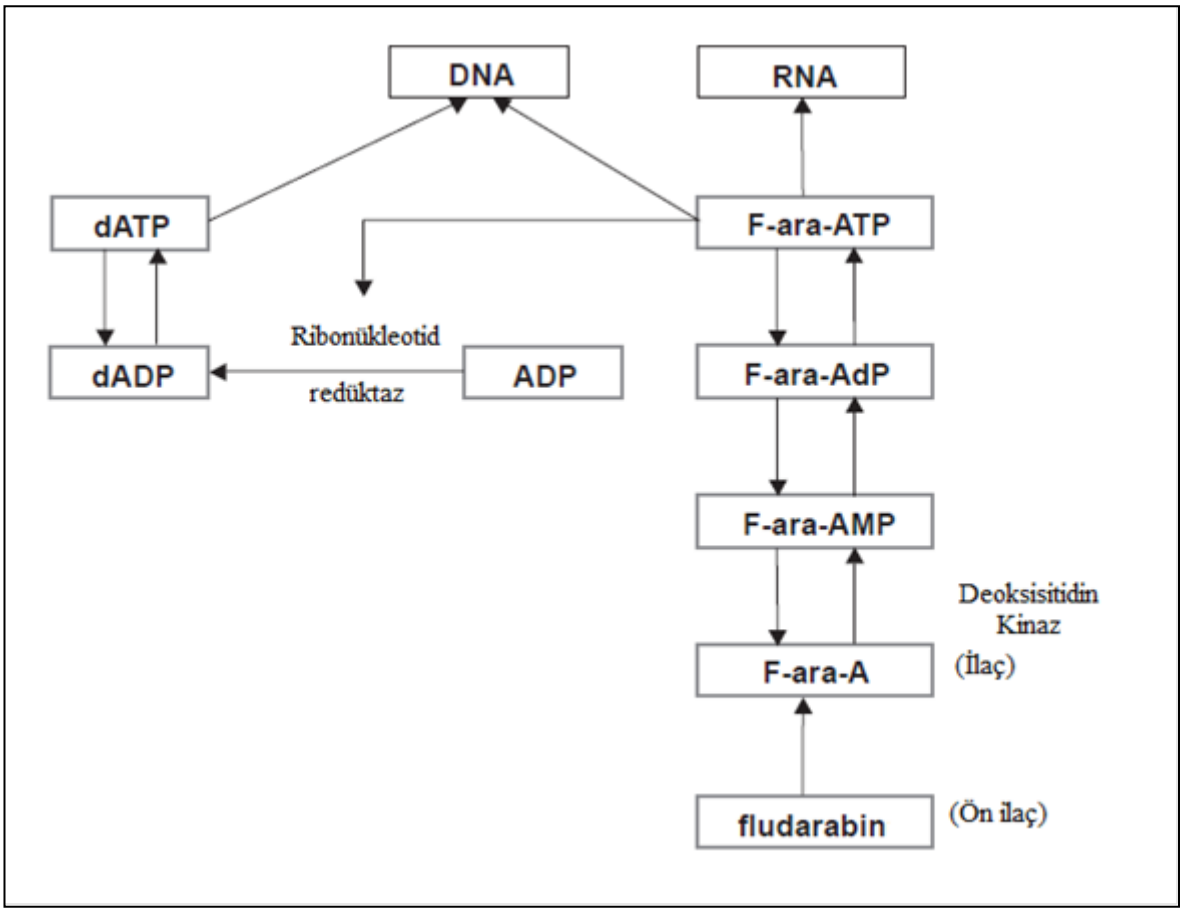


Şekil 2.12. DHA'nın TCTP'ye bağlanmasının biyolojik sonuçları [22]

2.6. Fludarabin

Fludarabin (FLU), KLL tedavisinde etkili bir pürin analoğudur. Fludarabin'in etkinliği ve yan etkileri, etki mekanizmasıyla yakından ilişkilidir. Fludurabin, fizyolojik pH'da negatif olarak yüklüdür ve bu yüzden hücrelere girememektedir. Bu sebeple Fludarabin, in vivo olarak serum fosfatazlar tarafından defosforile olup serbest nükleozid 9-β-$_D$-arabinozil-2-floroadenin'e (2-F-ara-A) dönüşen bir ön ilaç olarak fonksiyon görmekte ve böylelikle hücre içine alınmaktadır. 2-F-ara-A, 2-F-ara-AMP oluşturmak için deoksisitidin kinaz tarafından tekrar fosforillenmektedir. Daha sonra F-ara-AMP, bir ATP zinciri ve biyolojik olarak aktif 5'-trifosfat aktif bileşenini (F-ara-ATP) oluşturmak için yeniden fosforillenmektedir. Aktif ilaç F-ara-ATP, yalnızca transkribe olan DNA zincirine direk olarak eklenerek DNA sentezini inhibe etmekle kalmaz, aynı zamanda ribonükleotid redüktaz üzerine de etki etmekte ve böylece RNA translasyonunu da durdurmaktadır.

DNA'daki bu kırıklar ve protein sentezindeki kesintiler, poli(ADP-riboz) polimeraz ve p53 yolaklarının aracılık ettiği hücre apoptozuna neden olmaktadır (Şekil 2.12) [198-200].



Şekil 2.13. Fludurabin'in metabolizması ve etki mekanizması [200]

Fludarabin, genellile alkilleyici ajanlar, rituximab veya her ikisi ile birlikte kombinasyon halinde uygulanmaktadır, bu da iyileşmiş yanıt oranları, tam remisyon oranı ve artmış remisyon süresine neden olmaktadır [201]. Fludarabin, akut lösemiyi tedavi etmek için yüksek dozlarda kullanıldığında ağır demiyelinasyona neden olurken, solid tümörleri ve lenfomayı tedavi etmek için düşük dozlarda kullanıldığında bu gözlenmemiştir. Başlıca dozu sınırlayan toksik etkisi, myelosupresyon ve lökopenidir [202]. Çalışmamız da kullandığımız Fludarabin fosfat (9-13-D-arabino-furanozil-2- floro-adenin 5-monofosfat, Fludara^{TM} I.V.), 1969 yılında sentezlenen sentetik bir pürin antimetabolitidir [203].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. PGA-1 hücre serisi

Çalışmamızda kullanılan PGA-1 hücre serisinin karakteristik özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PGA-1 hücre serisi

DSMZ kayıt no	:	ACC 766
Tür	:	İnsan
Hücre tipi	:	Kronik B hücre lösemisi
Köken	:	1988 yılında kronik lenfositik lösemili Kafkas kökenli bir erkeğin lösemik B hücrelerinden elde edilmiştir; hücrelerin, literatürde in vivo EBV ile enfekte olduğu belirtilmektedir.
Risk değerlendirmesi	:	PZR analiziyle Epstein–Barr virüs (EBV, HHV-4) açısından pozitiftir. Bununla birlikte, EBV'nin çeşitli hücresel uyaranlara karşı ilk yanıt veren proteini BZLF-1 ifadelenmesi, muamele edilmemiş ve forbol ester / sodyum bütirat ile uyarılmış hücrelerde western blot yöntemiyle analiz edildiğinde negatiftir. Enfeksiyon, aktif virüslerin üretimi olmadan latent enfeksiyon olarak sınıflandırılmıştır. Hücrelerin kullanımı süresince EBV'nin geçişi mümkün değildir ve böylece hücre serisi, biyogüvenlik düzeyi 1 olarak kategorize edilmektedir. Almanya Biyogüvenlik Komisyonunun önerisine göre hücreler, genetik manipülasyonlar için kullanılacaksa biyogüvenlik düzeyi 2'de kullanılmalıdır.
Morfoloji	:	Kısmen kümelenmiş veya hafif düzeyde yapışkan olan düzensiz yuvarlak hücreler
Besiyeri	:	%90 RPMI 1640 + %10 ısı ile inaktive edilmiş FBS
Alt kültür	:	Yaklaşık 0,5-1 x 10^6 hücre/mL olduğunda pasaj yapılır; optimal bölme oranı her 2-3 günde bir 1:2 - 1:3; kültür genellikle fazla hücre debrisi içermektedir.
İnkübasyon	:	%5 CO_2 ile 37^{o}C'de
İki katına çıkma süresi	:	Yaklaşık 50 saat
Hücreleri toplama (harvest)	:	Yaklaşık 1.5 x 10^6 hücre/mL'de maksimum yoğunluk
Saklama	:	%70 besiyeri, %20 FBS, %10 DMSO ile dondurulma

3.1.2. CII hücre serisi

Çalışmamızda kullanılan CII hücre serisinin karakteristik özellikleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. CII hücre serisi

DSMZ kayıt no	:	ACC 773
Tür	:	İnsan
Hücre tipi	:	Kronik B hücre lösemisi
Köken	:	1979 yılında tanıda Rai II evresinde olan kronik lenfositik lösemili 47 yaşında bir kadının Epstein-Barr virüs (EBV) ile ölümsüzleştirilmiş neoplastik lenfositlerinden elde edilmiştir.
Risk değerlendirmesi	:	PZR analiziyle Epstein–Barr virüs (EBV, HHV-4) açısından pozitiftir. Bununla birlikte, EBV'nin çeşitli hücresel uyaranlara karşı ilk yanıt veren proteini BZLF-1 ifadelenmesi, muamele edilmemiş ve forbol ester / sodyum bütirat ile uyarılmış hücrelerde western blot yöntemiyle analiz edildiğinde negatiftir. Enfeksiyon, aktif virüslerin üretimi olmadan latent enfeksiyon olarak sınıflandırılmıştır. Hücrelerin kullanımı süresince EBV'nin geçişi mümkün değildir ve böylece hücre serisi, biyogüvenlik düzeyi 1 olarak kategorize edilmektedir. Almanya Biyogüvenlik Komisyonunun önerisine göre hücreler, genetik manipülasyonlar için kullanılacaksa biyogüvenlik düzeyi 2'de kullanılmalıdır.
Morfoloji	:	Yarı yapışkan hücreler, kümeler halinde çoğalarak yuvarlak ve oval morfoloji göstermektedir; uzun kültür süreleri, hücrelerin birbirine tutunmasına ve epiteloid morfolojiye neden olmaktadır.
Besiyeri	:	%90 RPMI 1640 + %10 ısı ile inaktive edilmiş FBS
Alt kültür	:	Yaklaşık 1-2 x 10^6 hücre/25 cm^2 olduğunda pasaj yapılır; Optimal bölme oranı her 2-4 günde bir 1:2 - 1:4; yapışan hücreler, flaska hafifçe vurularak ayrılabilmektedir.
İnkübasyon	:	%5 CO_2 ile 37°C'de
İki katına çıkma süresi	:	Yaklaşık 40-60 saat
Hücreleri toplama (harvest)	:	Yaklaşık 4 x 10^6 hücre/25 cm^2''lik hücre toplanması
Saklama	:	%70 besiyeri, %20 FBS, %10 DMSO ile dondurulma

3.1.3. MEC-1 hücre serisi

Çalışmamızda kullanılan MEC-1 hücre serisinin karakteristik özellikleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. MEC-1 hücre serisi

DSMZ kayıt no	:	ACC 497
Tür	:	İnsan
Hücre tipi	:	Kronik B hücre lösemisi
Köken	:	1993 yılında kronik B hücreli lösemili 61 yaşındaki Kafkas kökenli bir erkeğin periferik kanından elde edilmiştir.
Risk değerlendirmesi	:	PZR analiziyle Epstein–Barr virüs (EBV, HHV-4) açısından pozitiftir. Bununla birlikte, EBV'nin çeşitli hücresel uyaranlara karşı ilk yanıt veren proteini BZLF-1 ifadelenmesi, muamele edilmemiş ve forbol ester / sodyum bütirat ile uyarılmış hücrelerde western blot yöntemiyle analiz edildiğinde negatiftir. Enfeksiyon, aktif virüslerin üretimi olmadan latent enfeksiyon olarak sınıflandırılmıştır. Hücrelerin kullanımı süresince EBV'nin geçişi mümkün değildir ve böylece hücre serisi, biyogüvenlik düzeyi 1 olarak kategorize edilmektedir. Almanya Biyogüvenlik Komisyonunun önerisine göre hücreler, genetik manipülasyonlar için kullanılacaksa biyogüvenlik düzeyi 2'de kullanılmalıdır.
Morfoloji	:	Kümelenmiş küçük agregatlar, süspansiyon şeklinde çoğalan yuvarlak yada polimorfik hücreler şeklindedir, birkaç hücre hafifçe yapışkandır.
Besiyeri	:	%90 RPMI 1640 + %10 ısı ile inaktive edilmiş FBS
Alt kültür	:	Yaklaşık 0,5 x 106 hücre/mL olduğunda pasaj yapılır; çözüldükten sonra bir hafta boyunca hücreler ilk başta %20 FBS ile tutulmalıdır; 24-kuyucuklu plakta kültüre etmek avantajlıdır; her 2-3 günde bir 1:2 ile 1:3 oranında kültüre edilebilmektedir.
İnkübasyon	:	%5 CO_2 ile 37ºC'de
İki katına çıkma süresi	:	Yaklaşık 40 saat
Hücreleri toplama (harvest)	:	Yaklaşık 2 x 10^6 hücre/mL'lik hücre toplanması
Saklama	:	%70 besiyeri, %20 FBS, %10 DMSO ile dondurulma

3.1.4. Kullanılan cihazlar

Çalışmalar sırasında kullanılan cihazlar Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Cihazlar

Sıra No	Cihazın adı	Cihazın markası ve üretim yeri
1	Biyogüvenlik kabini	ESCO, Almanya
2	Karbondioksitli etüv	Memmert, Almanya
3	Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
4	Derin dondurucu, -20ºC	Regal, Türkiye
5	Derin dondurucu, -86ºC	Sanyo, Japonya
6	Hassas Terazi	Radwag, Polonya
7	Invert mikroskop	Zeiss, Almanya
8	Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
9	Soğutmalı santrifüj	Heraeus Sepatech, Almanya
10	Santrifüj	Sigma, Almanya
11	Mikroplak santrifüjü	Hettich, Almanya
12	Countess otomatik hücre sayım cihazı	Invitrogen, ThermoFischer Scientific, ABD
13	Spin vorteks	Biosan, Letonya
14	Vorteks karıştırıcı	Labinco, Hollanda
15	Mikroplak okuyucu	Tecan, İsviçre
16	Spektrofotometre	NanoDrop Lite, ThermoFischer Scientific, ABD
17	Isı döngüleyici	Eppendorf, Almanya
18	LightCycler Real-Time PCR cihazı	Roche, Almanya
19	Navios akım sitometri cihazı	Beckman Coulter, ABD
20	Mikropipetler, 10 uL, 100 uL, 1000 uL	Eppendorf, Almanya

3.1.5. Kullanılan sarflar

Çalışmalar sırasında kullanılan sarflar Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Sarflar

Sıra No	Sarfın adı	Sarfın markası ve üretim yeri
1	Hücre kriyo (dondurma) ampülü	Greiner, Almanya
2	Hücre kültür flaskları (25 cm^2 ve 75 cm^2)	SPL Life Sciences, Kore
3	Konik steril santrifüj tüpleri, 15 ve 50 mL	BD Biosciences, ABD
4	Mikrosantrifüj tüpleri	Axygen, ABD
5	96 kuyucuklu steril hücre kültür plağı	SPL Life Sciences, Kore
6	24 kuyucuklu steril hücre kültür plağı	SPL Life Sciences, Kore
7	6 kuyucuklu steril hücre kültür plağı	SPL Life Sciences, Kore
8	Steril filtreli pipet uçları (10 uL, 100 uL, 1000 uL)	BioPointe Scientific, ABD
9	Steril serolojik pipet (1 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL)	SPL Life Sciences, Kore
10	Steril pastör pipeti, 3 ml	SPL Life Sciences, Kore
11	Light Cycler 480 Multiwell Plak, 96	Roche, Almanya

3.1.6. Kullanılan kitler

Çalışmalar sırasında kullanılan kitler Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3. 6. Kitler

Sıra No	Kitin adı	Kitin markası ve üretim yeri
1	Hücre canlılığı kiti (XTT temelli)	Biological Industries, ABD
2	ANNEXIN V – FITC Kit – Apoptozu belirleme kiti	Affymetrix eBioscience, ABD
3	RNeasy Mini RNA izolasyon kiti	Qiagen, Almanya
4	Ipsogen RT cDNA sentez kiti	Qiagen, Almanya
5	Primerler	Alfa DNA, Almanya
6	Universal Probe Library (UPL) Probları	Roche, Almanya
7	LightMix Kit human ABL1	TIB-MolBiol, Almanya
8	Light Cycler® FastStart DNA Master Plus HybProbe kit	Roche, Almanya
9	Light Cycler® FastStart TaqMan Master Mix	Roche, Almanya
10	APC ile konjuge tavşan anti-insan TCTP antikoru	Assay Pro, ABD
11	Purifiye fare anti-insan Mcl-1 antikoru	BD Biosciences, ABD
12	FITC ile konjuge fare anti-insan Bcl-2 antikoru	BD Biosciences, ABD
13	Alexa-Fluor 488 ile konjuge fare anti-insan Bax antikoru	Biolegend, ABD
14	FITC ile konjuge fare anti-insan aktif kaspaz-3 antikoru	Novus Biologicals, ABD
15	Fare IgG1-FITC antikoru	Beckman Coulter, ABD
16	Fare IgG1-Alexa Fluor 488 antikoru	Biolegend, ABD
17	Tavşan IgG1-APC antikoru	Assay Pro, ABD
18	FITC keçi anti-fare IgG/IgM	BD Biosciences, ABD

3.1.7. Kullanılan kimyasal malzemeler

Çalışmalar sırasında kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Kimyasallar

Sıra No	Kimyasalın adı	Kimyasalın markası ve üretim yeri
1	RPMI 1640	HyClone, GE Healthcare Life Sciences, İngiltere
2	Fetal sığır serumu (FBS), inaktif	HyClone, GE Healthcare Life Sciences, İngiltere
3	L-Glutamin	Gibco, ABD
4	Penisilin-streptomisin	Gibco, ABD
5	β-mercaptoethanol	Gibco, ABD
6	PBS (Tuzlu fosfat tamponu)	PAN Biotech, Almanya
7	Etanol	Merck, Almanya
8	Dimetil sülfoksit (DMSO)	Santa Cruz, ABD
9	Fiksasyon reaktifi	Beckman Coulter, ABD
10	Permeabilizasyon çözeltisi	Beckman Coulter, ABD
11	Dihidroartemisinin (DHA)	MedChemExpress, ABD
12	Fludara (Fludarabin fosfat=FLU)	Sanofi, Fransa

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kanser hücre serilerinin kültürü

PGA-1, CII ve MEC-1 insan KLL hücre serileri RPMI'lı besiyerinde kültüre edildi. Bunun için 450 mL RPMI besiyeri içerisine, 50 mL ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS), 200 mM L-glutaminden 10 mL ve 100 U/mL penisilin ile 100 ug/mL streptomisin eklenerek %10' luk RPMI besiyeri hazırlandı. Daha sonra laboratuvarımızda yaklaşık -196°C'deki sıvı azot tankında, %10 DMSO içeren RPMI içerisinde dondurulmuş olarak stokta bulunan KLL hücre serilerinin, 37ºC'deki su banyosunda kapak kısmından tutulup sallanarak yaklaşık 1-2 dakikada çözülmesi beklendi. Çözünmüş KLL hücreleri, santrifüj tüpüne konulan 5 mL ısınmış olan hazırlanan besiyerine aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve üstündeki sıvı atıldı. Pelletler, 2 mL besiyeri ile süspanse edilip içinde RPMI besiyeri bulunan 75 cm^2'lik flasklar içine aktarılarak 37 ºC'de , %95 nem ve %5 CO_2 içeren ortamı sağlayan etüve koyuldu. Hücrelerin 2-3 günde bir kontrolleri yapıldı, besiyerleri değiştirilip yeni flasklara ve plaklara ekilerek deneyler için gereken hücre miktarları elde edildi. Hücrelerin pasajları ters bakışlı (inverted) mikroskop altında gözlendi.

Tüm hücre sayım işlemleri Countess® otomatik hücre sayım cihazı (Invitrogen, ABD) ile yapıldı. Bunun için cihaz için uygun olan lama çentikli kısmından 10 uL hücre/tripan

mavisi karışımı yüklenip lam cihaza yerleştirildi, sayım düğmesine basılarak hücre sayım işlemi başlatılarak hücre sayısı ekranda görüntülendi. %90 ve üzeri canlılık yapılacak deneyler için yeterli olarak kabul edildi.

3.2.2. 10 mM stok DHA ve FLU çözeltilerinin hazırlanması

10 mg DHA tartılıp son hacmi 3,5168 mL olacak şekilde saf dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü. Elde edilen 10^{-2} M stok çözeltisi 1 ve 0.5 mL'lik tüplere dağıtılarak -20 ºC'de saklandı.

Yine 10 mg FLU tartılıp son hacmi 2.7381 mL olacak şekilde saf dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü. Elde edilen 10^{-2} M stok çözeltisi 1 ve 0.5 mL'lik tüplere dağıtılarak -20 ºC'de saklandı.

3.2.3. DHA, FLU ve DHA+FLU uygulanan PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinde etkin dozun XTT yöntemi ile belirlenmesi

PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinde DHA, FLU ve DHA+FLU uygulanmasının hücrelerin canlılığı üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için kolorimetrik XTT yöntemi kullanıldı. Bunun için;

1) 75 cm^2'lik hücre kültür flasklarında 37 ºC, %95 nem ve %5 CO_2'li etüvde çoğaltılan insan KLL hücre serileri deney için taze kullanılmak üzere 50 mL'lik falcon tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 10 mL besiyeri eklendi. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve üstündeki sıvı atıldı. Hücre pelleti %10 FBS içeren RMPI besiyeri ile homojen bir şekilde süspanse edildi. Tripan mavisi ile hücreler boyanıp otomatik hücre sayım cihazında sayıldı. Deneyler için 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına her kuyucuğa 10.000 hücre / 100 uL olacak şekilde ekildi.
2) Bir gece sonra hücrelerin üzerine ilk deneyde 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M olacak şekilde seri konsantrasyonlar halinde, daha sonra da PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinin canlılık oranlarının artan DHA, FLU ve DHA+FLU konsantrasyonularına bağlı olarak düştüğü görüldüğü ve IC_{50} konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla da 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarda olacak şekilde DHA, 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarda olacak

şekilde FLU, (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında olacak şekilde de DHA ve FLU birlikte %10'luk RPMI içerisinde seyreltilmiş olan stok çözeltilerinden eklendi. Her bir konsantrasyon için deney üç tekrarlı yapıldı. DMSO çözücü kontrolü kullanıldı ve aynı süreler için inkübe edildi. Daha sonra hücreler 24, 48 ve 72 saat süreyle 37°C'de %5 CO2'li etüvde inkübe edildi.

3) İnkübasyon süresi bitince 96 kuyucuklu plak 1500 rpm'de 10 dakika boyunca mikroplak santrifüjü kullanılarak santrifüjlendi. Santrifüj sonrası üzerinden besiyeri dikkatlice çekilip atılarak her bir kuyucuğa 100 uL yeni besiyeri eklendi.
4) İnkübasyon süresi bitimine yakın -20ºC'de bulunan XTT reaktif çözeltisi ve aktivasyon çözeltesi hızlı bir şekilde 37°C'lik bir su banyosunda çözdürüldü. 96 kuyucuklu bir plak için yeterli miktarda bir reaksiyon çözeltisi hazırlanması amacıyla 5 mL XTT reaktifinin içine 0,1 mL aktivasyon çözeltesi eklendi.
5) Daha sonra her bir kuyucuğa 50 uL reaksiyon çözeltisi eklendi, plak kuyucuklardaki boyanın eşit oranda dağılması için nazik bir şekilde çalkalandı ve 5 saat boyunca 37°C'de %5 CO_2'li etüvde inkübe edildi. Formazan kristalleri çözündükten sonra 450-500 nanometrelik bir dalga boyunda mikroplak okuyucuyla (Tecan, İsviçre) ölçüldü.
6) Her bir doz için deney 3 tekrarlı yapılarak ortalama absorbans değerleri belirlendi. Elde edilen ortalama absorbans değerleri, madde uygulaması yapılmayan kontrole oranlanarak hücre canlılığı üzerine ajanların etkisi belirlendi. Sadece besiyeri ve XTT reaktif çözeltisini içeren örnekler absorbansların belirlenmesinde kör olarak kullanıldı. Hücre canlılığının hesaplanması için örneklerin absorbans değerlerinden kör örneğin absorbans değeri çıkartıldı. Daha sonra örneklere ait 3 farklı absorbans değerinin ortalaması alındı. Sadece hücre içeren kontrol örneğinin ortalama absorbansı %100 canlılığa karşılık gelen değer olarak kabul edildi ve ilaç uygulanan hücrelerden elde edilen absorbans değerleri, kontrol hücrelerine göre oranlanarak hücre canlılığı yüzde olarak aşağıda da gösterildiği şekilde belirlendi.

$$\%\ \text{Canlılık oranı} = \frac{\text{Örneğin ortalama OD değeri}}{\text{Kontrolün ortalama OD değeri}} \times 100$$

3.2.4. Hücre kültüründen total RNA'nın elde edilmesi

Hücreler, 1 x 10^6/mL hücre olacak şekilde kültüre edilip çoğaldıktan sonra hücrelere XTT yöntemiyle belirlenen DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonları uygulandı, herhangi bir ajan uygulanmayan hücre grupları kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyon sürelerinin dolmasıyla, hücrelerden RNA izolasyonu, RNeasy Mini kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak, kitte belirtilen aşağıdaki protokole göre biyogüvenlik kabininin içinde yapıldı.

1) Başlamadan önce her 1 mL Buffer RLT içerisine 10 uL β-Merkaptoethanol konularak lizis çözeltisi hazırlandı. Bununla birlikte kitteki yıkama tamponlarından biri olan Buffer RPE'ye de 4 katı etanol (%96-100) eklendi.
2) Daha sonra hücrelerin üzerine 600 uL hazırlanan lizis çözeltisi olan Buffer RLT karışımından eklenip lizat homojenize edildi ve 3 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi.
3) Santrifüjden sonra süpernatan dikkatli bir şekilde pipetle alındı ve lizatın üzerine %70'lik etanol eklendi ve pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı.
4) Bu karışımın 700 uL'si, 2 mL'lik bir toplama tüpüne yerleştirilen RNeasy Mini spin kolonun içine aktarıldı, kapağı kapatılıp 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
5) Toplama tüpü ve toplanan sıvı atılıp kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. 700 uL yıkama çözeltisi Buffer RW1, RNeasy Mini spin kolonun içine aktarıldı, kapağı kapatılıp 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
6) Toplama tüpü ve toplanan sıvı atılıp kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. 500 uL önceden hazırlanmış yıkama çözeltisi Buffer RPE, RNeasy Mini spin kolonun içine aktarıldı, kapağı kapatılıp 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
7) Toplama tüpü ve toplanan sıvı atılıp kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Tekrar 500 uL önceden hazırlanmış yıkama çözeltisi Buffer RPE, RNeasy Mini spin kolonun içine aktarıldı, kapağı kapatılıp 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
8) Toplama tüpü ve toplanan sıvı atılıp kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve membranın kuruması için 13000 rpm'de 1 dakika tekrar santrifüj edildi.
9) RNeasy Mini spin kolon yeni bir 1,5 mL'lik toplama tüpüne alındı. Spin kolon membranına direk olarak RNAse içermeyen sudan 30 uL eklendi, tüpün kapağı kapatılıp 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
10) Elde edilen RNA miktarları ve saflıklar, NanoDrop® Lite Spektrofotometre cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılana kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.2.5. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için Ipsogen® RT kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı ve aşağıda belirtilen kit protokolü uygulandı.

1) Öncelikle elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Son hacim olan 10 uL içinde 1000 ng total RNA olacak şekilde tüm RNA'ların sulandırmaları yapılıp 0,2 mL'lik tüplere dağıtıldı.
2) 65^{o}C'de 5 dakika inkübe edildi ve örnekler buzun üzerine alınıp ters transkripsiyon PCR (RT-PCR) tepkime karışımı hazırlandı. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Ters transkripsiyon PCR (RT-PCR) tepkime karışımın hazırlanması

RT-PCR tepkime içeriği	**Her bir örnek başına hacim (uL)**	**Son konsantrasyon**
5x reaksiyon tamponu	5,0	1x
dNTP (her biri 10 mM)	2,0	0,8 mM
Random nonamer (100 uM)	5,25	21 uM
Rnaz inhibitör (40 U/uL)	0,5	0,8 U/uL
Ters transkriptaz (200 U/uL)	1,0	8 U/uL
DTT	1,25	-
Her örnek için RT-PCR tepkime hacmi	**15**	

3) İnkübasyondan sonra her bir RNA örneğinin üzerine hazırlanan karışımdan 15 uL eklendi ve nazikçe pipetaj yapılarak karıştırıldı.
4) Daha sonra bir otomatik ısı döngüleyici cihazı kullanılarak aşağıda belirtilen ters transkripsiyon programı uygulandı (Çizelge 3.9). Böylelikle cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı.
5) Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR'da kullanılana kadar -20 °C'lik derin dondurucuda saklandı.

Çizelge 3.9. Otomatik ısı döngüleyici cihazında uygulanan program

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25^{o}C	10 dk	1
Ters Transkripsiyon	50^{o}C	60 dk	1
İnaktivasyon	85 ^{o}C	5 dk	1
Soğutma	4 ^{o}C	5 dk	1

3.2.6. Gen ifadesinin Real-Time PCR ile belirlenmesi

TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin mRNA ifadesinin kantitatif değerlendirmesi, Real-Time PCR yöntemi ile Light Cycler®480 cihazı kullanılarak belirlendi. TCTP ve Mcl-1 genleri için amplifikasyonlar, 20 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, mRNA'ya özgü primerler, FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) probları, Light Cycler® FastStart DNA Master Plus Hybprobe karışımı ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genleri için amplifikasyonlar ise, 10 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, mRNA'ya özgü primerler, Universal ProbeLibrary (UPL probu), LightCycler® TaqMan Master karışımı ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 ifadelenme miktarlarını normalize etmek için LightMix® human ABL1 kit (TIB-MolBiol, Almanya) kullanılarak ABL1 mRNA düzeyi referans olarak alındı. Seçilen genler ile ilgili özgün primer ve prob listeleri Tablo 3.10 ve Tablo 3.11'de verilmiştir. Kullanılan problar Roche Diagnostics'ten temin edildi. Tüm cDNA örnekleri, her bir gen için en az üçer kez çalışıldı.

Çizelge 3.10. TCTP ve Mcl-1 genlerine özgü primer ve prob dizileri [148]

	TCTP	***Mcl-1***
Forward Primer	ACCAGTGATTACTGTGCTTT	GTCTTGATGTTTGTTCTATCAGACTTA
Reverse Primer	AGCCACGATGAGATGTTC	GGTCACTCAGGTTTCCAG
FRET Prob 1	GTTACCTTCTGTCCTACTGACCATCTT - Fluorescein	CCCTCTACAGATATTTATATCAATTCCTACAGCT T - Fluorescein
FRET Prob 2	LC Red 640 – CCTCCACCTCCAGGCACAACC - Phosphate	LC Red 640 - CCCTGCCATCCCTGAACTCTTTCTAGC - Phosphate

Çizelge 3.11. Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerine özgü primer dizileri ve prob numaraları

	Forward Primer	**Reverse Primer**	**UPL Prob Numarası**
BCL-2	5'- AGTACCTGAACCGGCACCT -3'	5'- GCCGTACAGTTCCACAAAGG -3'	75
BAX	5'- ATGTTTTCTGACGGCAACTTC -3'	5'- ATCAGTTCCGGCACCTTG -3'	57
KASPAZ3	5'- TGGAATTGATGCGTGATGTT -3'	5'- TGGCTCAGAAGCACACAAAC -3'	68

3.2.7. TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve ABL1 genleri için Real-Time PCR tepkime karışımı

TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve ABL1 genlerine uygun belirtilen primer ve problar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenler Tablo 3.12, Tablo 3.13 ve Tablo 3.14'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. TCTP ve Mcl-1 Real-Time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH_2O	-	9,8 uL
Primer F (10 pmol/uL)	4 pmol	0,4 uL
Primer R (10 pmol/uL)	4 pmol	0,4 uL
FRET Prob 1 (10 pmol/uL)	2 pmol	0,2 uL
FRET Prob 2 (10 pmol/uL)	2 pmol	0,2 uL
Fast Start Master Plus Karışımı (1a'dan 1b'ye 10 ul aktarılır)	-	4 uL
cDNA	-	5 uL

Çizelge 3.13. Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 Real-Time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH_2O	-	6,2 uL
$MgCI_2$ (25 mM)	4 mM	1,2 uL
Primer F (10 pmol/uL)	2,5 pmol	0,25 uL
Primer R (10 pmol/uL)	2,5 pmol	0,25 uL
TaqMan prob (100 pmol/uL)	10 pmol	0,1 uL
TaqMan karışımı (10x)	1x	1 uL
cDNA	-	1 uL

Çizelge 3.14. ABL1 Real-Time PCR tepkime karışımı

	Hacim
dH_2O	7 uL
Reaktif karışımı (66 uL dH_2O sulandırılan primer-prob karışımı)	4 uL
Fast Start Master Plus Karışımı (1a'dan 1b'ye 10 ul aktarılır)	4 uL
cDNA	5 uL

3.2.8. Light Cycler (LC) deney programi

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra LightCycler® 480 cihazına uygun 96 kuyucuklu plağa dağıtıldı ve üzerine cDNA'lar eklendi. Plak, 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Plak cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 3.15'de belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve ABL1 genleri için aynı program kullanıldı.

Çizelge 3.15. TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve ABL1 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)	
Program Verisi	**Değer**
Döngüler	1
Analiz Modu	-
Sıcaklık Hedefleri	**Kısım 1**
Hedef Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10:00dk
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Çizelge 3.15. (devam). TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve ABL1 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)		
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program Verisi	**Değer**	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	**Kısım 1**	**Kısım 2**
Hedef Sıcaklık (°C)	95	50
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	15sn	10sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0
Program 3. Soğutma		
Program Verisi	**Değer**	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	**Kısım 1**	
Hedef Sıcaklık (°C)	40	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	

Reaksiyon sonucu deney gruplarına ait TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve ABL1 genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 gen ifade düzeyleri ABL1 ifade düzeyine göre normalize edildi.

3.2.9. Apoptoz tespiti : Anneksin V-FITC/PI yöntemi

PGA-1, CII ve MEC-1 KLL hücre serilerine DHA ve FLU ayrı ayrı, DHA+FLU'nun birlikte uygulanmasının apoptoz üzerine etkileri Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (eBioscience™, ABD) kullanılarak, akım sitometride tespit edildi.

1) Yönteme başlamadan önce Bağlama Tamponu (4x) (Binding Buffer) 1:4 oranında distile su ile dilüe edildi (50 mL bağlama tamponu ve 150 mL distile su).
2) Daha sonra hücreler 2 kere soğuk PBS ile yıkandı ve hücre yoğunluğu $5x10^5$ hücre/mL olacak şekilde 200 uL Bağlama Tamponu (1x) eklenerek süspansiyon oluşturuldu.
3) 195 uL hücre süspansiyonuna 5 uL Annexin V-FITC eklenip oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
4) İnkübasyon sonunda 200 uL Bağlama Tamponu (1x) ile hücreler yıkandı ve 190 uL Bağlama Tamponu (1x) ile hücreler yeniden süspanse edildi.
5) 10 uL Propidyum İyodür (20 ug/mL) eklendi ve akım sitometri ile analiz edildi.

3.2.10. Akım sitometri ile TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax, aktif Kaspaz-3 düzeylerinin belirlenmesi

TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax, aktif Kaspaz-3 sitoplazmik proteinler olduğundan akım sitometride indirekt immünfloresan boyama yapıldı.

1) Falkon tüplerine alınan hücrelerin üzerine PBS eklenerek 1200 rpm'da 5 dakika santrifüj edildikten sonra pelletin üzerine tekrar 900 uL PBS eklendi. Bu hücrelerin üzerine 100 uL insan serumu eklenip 10 dakika inkübasyondan sonra tekrar santrifüj edilip PBS eklenerek hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu hücre süspansiyonundan 100 uL alındı.
2) 100 uL Reagent 1 (Fiksasyon reaktifi) eklendi. Vortekslendi. 10 dakika beklendi.
3) Tüplere 2 mL ISOFLOW (yıkama tamponu) konarak 300 xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
4) Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant pellet oynatılmadan pipetle atıldı.
5) Tüplerin dibindeki pelletin üzerine 100 uL Reagent 2 (Permeabilizasyon çözeltisi) eklendi.
6) Yavaşça karıştırılarak (pipetaj yapılarak) tüp dibindeki pellet çözüldü. 5 dakika beklendi.
7) Tüplere çalışılacak antikorlar eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi.
8) Üzerlerine 2 mL ISOFLOW (yıkama tamponu) eklendi. Vortekslendi.
9) 300 xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
10) Tüpler yavaşça dökülerek süzüldü, ağız kısmı kurulandı.
11) Floresan işaretli olmayan antikorun konulduğu tüpe IgG/IgM-FITC sekonder antikoru eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi, sonra yıkama tamponu eklenip vortekslendi ve santrifüj edildi.
12) Diğerlerinin üzerlerine de 2 mL ISOFLOW (yıkama tamponu) eklendi. Vortekslendi.
13) 300 xg'de 5 dak santrifüj edildi.
14) Süpernatant atıldı.
15) 500 uL ISOFLOW (yıkama tamponu) eklendi. Cihazda okuma yapıldı.

3.3. İstatistik analizler

Tüm gruplar kendi içerisinde Levene homojenite testine tabi tutuldu ve verilerde homojenite varsa parametrik test olarak gruplar arasında ANOVA ve Student's t testleri yapıldı. Araştırma verileri araştırmacı tarafından Microsoft-Excel programına girilmiştir. Veriler "SPSS 18.0" istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. 0.05'den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İnsan Kronik Lenfositik Lösemi Hücre Serileri

Dihidroartemisin'in insan kronik lenfositik lösemi hücre serilerinde apoptoza etkilerinin immünomoleküler olarak değerlendirilmesi için 3 farklı hücre serisi kullanıldı: Bunlar PGA-1, MEC1 ve CII insan KLL hücre serileridir. Bu KLL hücre serileri, aşağıda belirtilen özelliklerinden dolayı seçilmiştir.

PGA-1 hücre serisi, 1988 yılında kronik lenfositik lösemili Kafkas kökenli bir erkeğin lösemik B hücrelerinden elde edilmiştir. CII hücre serisi, 1979 yılında tanıda Rai-Binnet evrelemesine göre orta riskli grupta (Rai II evresinde) olan kronik lenfositik lösemili 47 yaşında bir kadının Epstein-Barr virüs (EBV) ile ölümsüzleştirilmiş neoplastik lenfositlerinden elde edilmiştir. MEC-1 hücreleri ise, 1993 yılında tanıda yine Rai II evresinde olan kronik B hücreli lösemili 61 yaşındaki Kafkas kökenli bir erkeğin periferik kanından elde edilmiştir. Bu hücrelerde KLL'de B hücre popülasyonunun ifade ettiği akım sitometrik olarak belirlenmiş yüzey belirteçleri olduğu anlaşılmaktadır. PGA-1 ve MEC-1 hücrelerinde IgVH mutasyonu bulunurken, CII hücresinde IgVH mutasyonu bulunmamaktadır. PGA-1 hücre serisinde KLL vakalarında görülen 13q'nun delesyonu ve kromozom 12'nin kazanımı (trizomi 12) varken, CII hücre serisinde trizomi/tetrazomi 12 ve MEC-1 hücre serisinde ise tümör baskılayıcı gen TP53'ü silen 17p delesyonu bulunmaktadır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. KLL hücre serilerinin özellikleri [204]

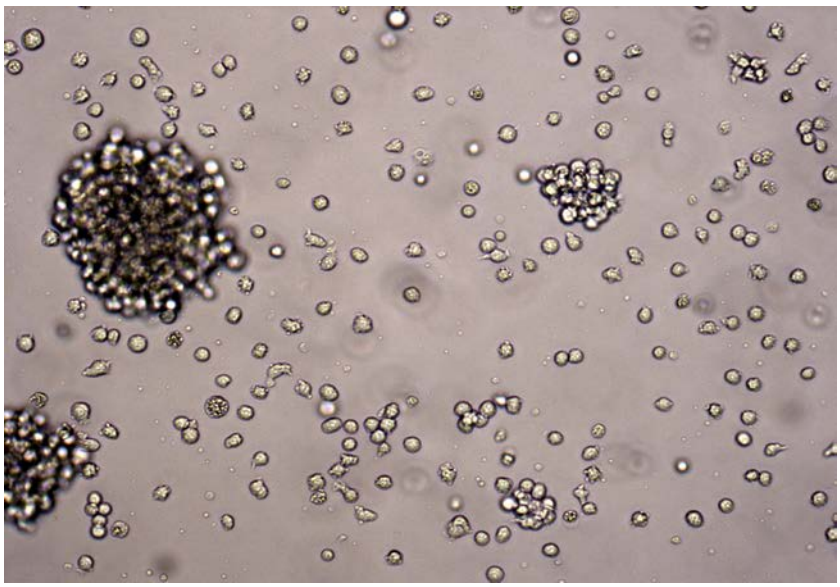
KLL hücre serisi	Hastanın yaşı / cinsiyeti / Binnet, Rai evresi	Yüzey belirteçleri	IGHV mutasyon durumu	Karyotipi
PGA-1 (DSMZ no: ACC 766)	- / Erkek / -	IgG +, λ +, CD3 -, CD4 -, CD5 -, CD10 -, CD13 -, CD14 -, CD15 +, CD19 +, CD20 +, CD34 -, CD37 +, CD38 +, CD80 +, HLA-DR +	Mutasyonlu	13q-, + 12
CII (DSMZ no: ACC 773)	47 / Kadın / Rai II	IgM +, λ +, CD3 -, CD5 +, CD10 -, CD13 -, CD19 +, CD20 +, CD34 -, CD37 +, CD38 +, cyCD79a +, CD80 +, HLA-DR +	Mutasyonsuz	trizomi/tetrazomi 12
MEC-1 (DSMZ no: ACC 497)	61 / Erkek / Rai II	CD3 -, CD10 -, CD13 -, CD19 +, CD20 +, CD34 -, CD37 +, CD38 +, cyCD79a +, CD80 +, CD138 +, HLA-DR +	Mutasyonlu	12-, 17p-

4.1.1. İnsan kronik lenfositik lösemi hücre serilerinin çoğaltılması

PGA-1, MEC1 ve CII insan KLL hücre serileri, 75cm^2'lik flasklarda 37^{0}C ve %5 CO_2 içeren etüvde, %10 FBS'li RPMI besi yerinde kültüre edildi. Kültüre alınan hücrelerin bir kısmı yüzeye tutanmaya ve yaklaşık 48 saatten itibaren yayılmaya başladılar. Yaklaşık % 80 bolluk

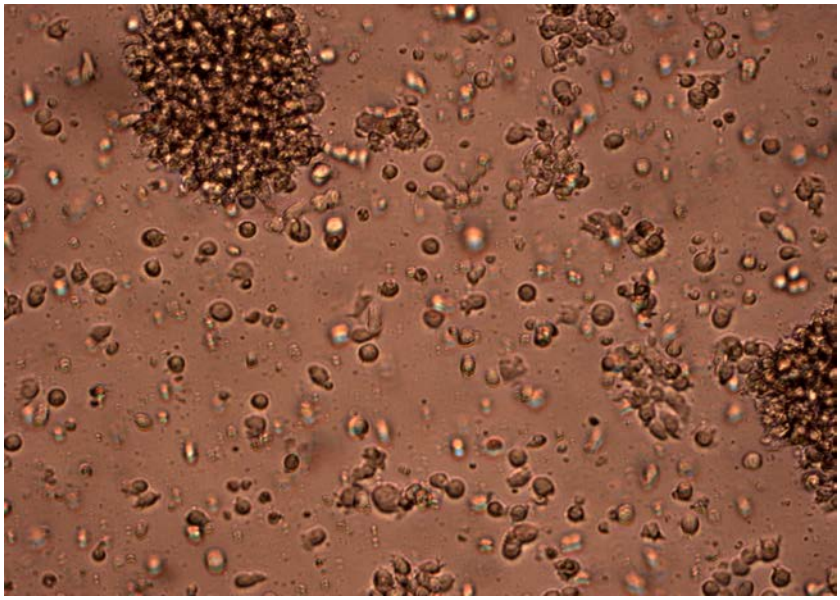
noktasına ulaşan hücreler pasajlanarak alt kültürlere geçildi. Hücrelerin kültürlerinin her aşaması ters bakışlı (inverted) mikroskop yardımıyla düzenli olarak takip edildi ve morfolojik görüntüleri kaydedildi.

Buna göre PGA-1 hücre serisinin morfolojisi, kısmen kümelenmiş veya hafif düzeyde yapışkan olan düzensiz yuvarlak hücreler şeklinde görüldü (Resim 4.1).



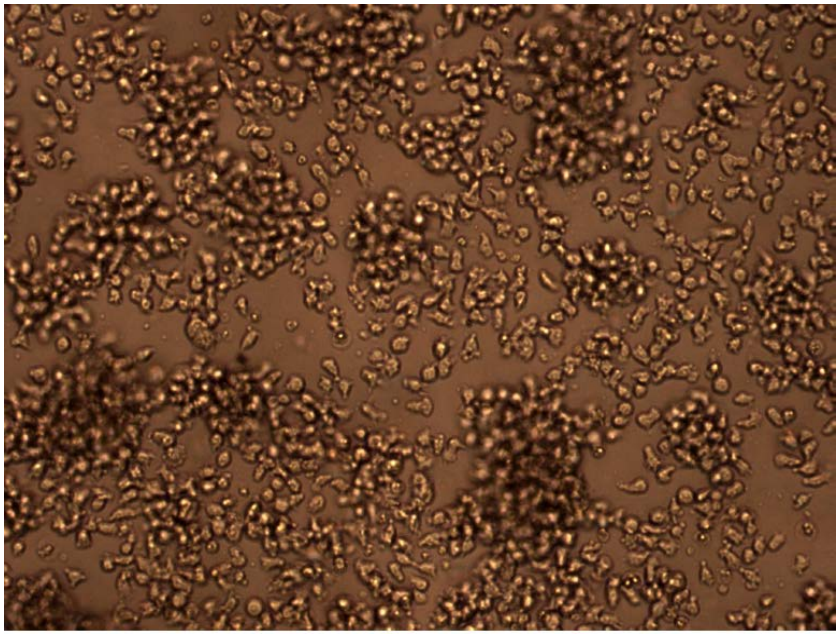
Resim 4.1. PGA-1 hücre serisinin mikroskop altında görüntüsü

CII hücreleri ise kümeler halinde, yarı yapışkan, yuvarlak ve oval morfolojidedir (Resim 4.2).



Resim 4.2. CII hücre serisinin mikroskop altında görüntüsü

MEC-1 hücre serisinin morfolojisi ise kümelenmiş küçük agregatlar halinde yuvarlak yada polimorfik hücreler şeklindedir, hafif bir şekilde yapışkandır (Resim 1.3).



Resim 4.3. MEC-1 hücre serisinin mikroskop altında görüntüsü

4.2. Deney Grupları

Çalışmamızda kullandığımız PGA-1, CII ve MEC-1 insan KLL hücre serilerinde, çeşitli konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde DHA'nın tek başına, FLU'nun tek başına ve DHA'nın FLU ile birlikte uygulanması sonucu oluşan sitotoksik ve apoptotik etkiler mRNA ve protein düzeylerinde araştırıldı. Bu amaçla 4 deney grubu oluşturuldu:

1- *Kontrol grubu:* PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerine DHA veya FLU uygulanmadı.
2- *Dihidroartemisinin (DHA) grubu:* PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerine DHA'nın önce 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M olacak şekilde seri konsantrasyonları, sonra IC_{50} değerini belirlemek için 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonları uygulandı.
3- *Fludarabin (FLU) grubu:* PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerine FLU'nun önce 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M olacak şekilde seri konsantrasyonları, sonra IC_{50} değerini belirlemek için 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonları uygulandı.
4- *Dihidroartemisinin (DHA) + Fludarabin (FLU) grubu:* PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerine DHA ve FLU'nun önce birlikte 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8}

M, 10^{-9} M, 10^{-10} M olacak şekilde seri konsantrasyonları, sonra IC_{50} değerini belirlemek için (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığı uygulandı.

4.3. DHA ve FLU'nun İnsan Kronik Lenfositik Lösemi Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkileri

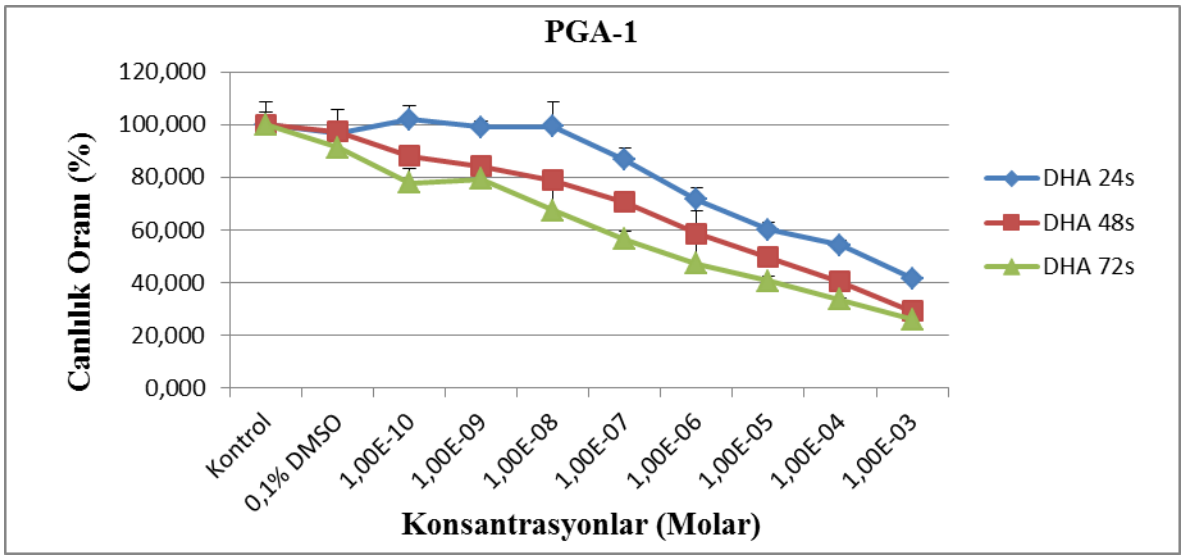
Öncelikle XTT (2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid) kullanılarak DHA ve FLU'nun ayrı ayrı ve birlikte kullanımlarının PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi araştırıldı. Bir tetrazolyum tuzu olan XTT, renksiz ya da hafif sarı renkli bir bileşik olup indirgendiğinde parlak portakal rengine dönüşmektedir. Bu renk değişikliği pozitif yüklü kuaterner tetrazol halkasının kırılması ve ayrılması sebebiyle gerçekleşmektedir. Aktif olarak prolifere olan hücrelerde XTT dönüşümündeki artış spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Buradan elde edilen canlılık oranlarından, kullanılan ilaçların KLL hücrelerinin canlılığında %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonları yani IC_{50} konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat DHA ve FLU ayrı ayrı ve DHA+FLU birlikte uygulanmasına verdiği cevabı belirlemek için 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekildi. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı ve kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. Bu deneyde kullanılan çözücünün (DMSO) ortamdaki oranı %1 olarak belirlendi. Bu oranlarda DMSO, hücreler üzerinde sitotoksik bir etki göstermedi. Hücreler, konsantrasyonları 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M olacak şekilde seri konsantrasyonlar halinde DHA ve FLU ayrı ayrı ve DHA+FLU ile 24, 48 ve 72 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin sonunda ilaçlar ile uyarılan hücre gruplarının canlılık oranları, kontrol grubundaki hücrelerin canlılık oranları ile karşılaştırılarak sonuçlar "% canlılık oranı" şeklinde hesaplandı ve standart sapma değerleri belirlendi.

4.3.1. DHA ve FLU'nun PGA-1 hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri

PGA-1 hücrelerinin, seri konsantrasyonlar halinde uygulanan DHA, FLU ve DHA+FLU'ya olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yöntemi sonuçlarına göre PGA-1 hücrelerinin canlılık oranlarının, 24, 48 ve 72 saat

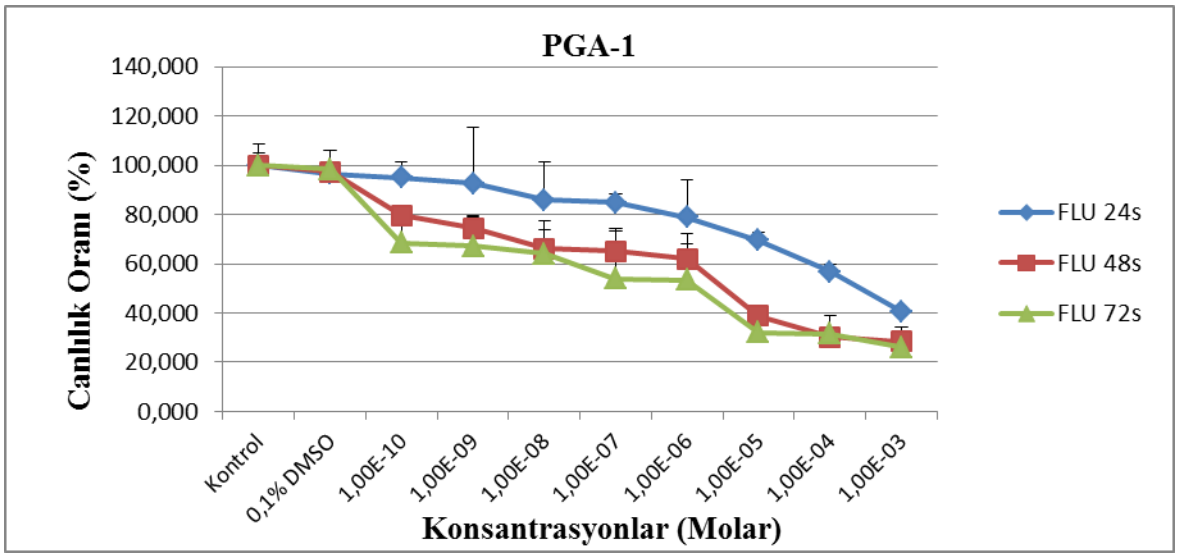
inkübasyon sonunda DHA, FLU ve DHA+FLU'nun artan konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı görüldü.

Şekil 4.1'de PGA-1 hücrelerinin, seri konsantrasyonlar halinde uygulanan DHA'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan konsantrasyonlar molarite cinsinden, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi. DHA'nın özellikle 10^{-7}M konsantrasyonun uygulanmasıyla 24 saatlik inkübasyondan sonra %86,65 canlılık oranı görüldü. Bu konsantrasyondan sonra molaritesi yükselerek artan diğer konsantrasyonlarda canlılık oranında belirgin bir düşüş görülürken, uygulanan en yüksek DHA konsantrasyonu olan 10^{-3} M'da canlılık oranı %41,64 belirlendi.



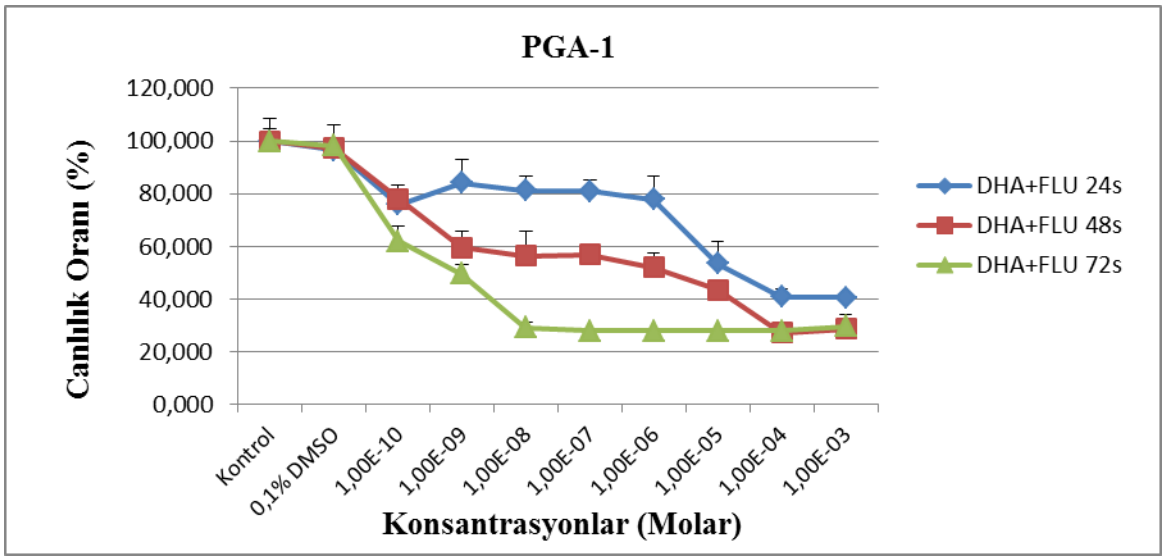
Şekil 4.1. PGA-1 hücrelerinin DHA'nın seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları

Şekil 4.2'de de PGA-1 hücrelerinin, seri konsantrasyonlar halinde uygulanan FLU'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi. FLU'nun özellikle 10^{-7} M konsantrasyonun uygulanmasıyla 24 saatlik inkübasyondan sonra %84,81 canlılık oranı görüldü. Bu konsantrasyondan sonra canlılık oranında belirgin bir düşüş görülürken, uygulanan en yüksek FLU konsantrasyonu olan 10^{-3} M'da %40,54 canlılık oranı belirlendi.



Şekil 4.2. PGA-1 hücrelerinin FLU'nun seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları

Şekil 4.3'de PGA-1 hücrelerinin, seri konsantrasyonlar halinde uygulanan DHA+FLU'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi. DHA+FLU'nun özellikle 10^{-7} M konsantrasyonunda 24 saatlik inkübasyonundan sonra ise %80,89 canlılık oranı görüldü. Bu konsantrasyondan sonra canlılık oranında belirgin bir düşüş görülürken uygulanan en yüksek DHA+FLU'nun birlikte konsantrasyonu olan 10^{-3} M'da %40,53 canlılık oranı belirlendi.

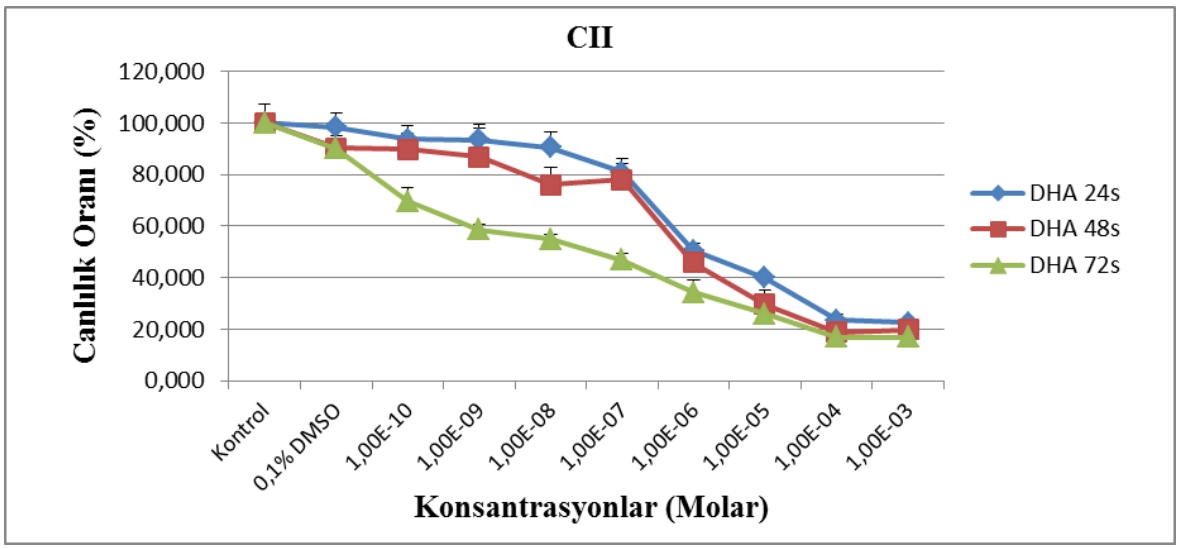


Şekil 4.3. PGA-1 hücrelerinin DHA+FLU'nun seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları

4.3.2. DHA ve FLU'nun CII hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri

CII hücrelerinin, seri konsantrasyonlar halinde uygulanan DHA, FLU ve DHA+FLU'ya olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yöntemi sonuçlarına göre CII hücrelerinin canlılık oranları, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda artan DHA, FLU ve DHA+FLU konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı görüldü.

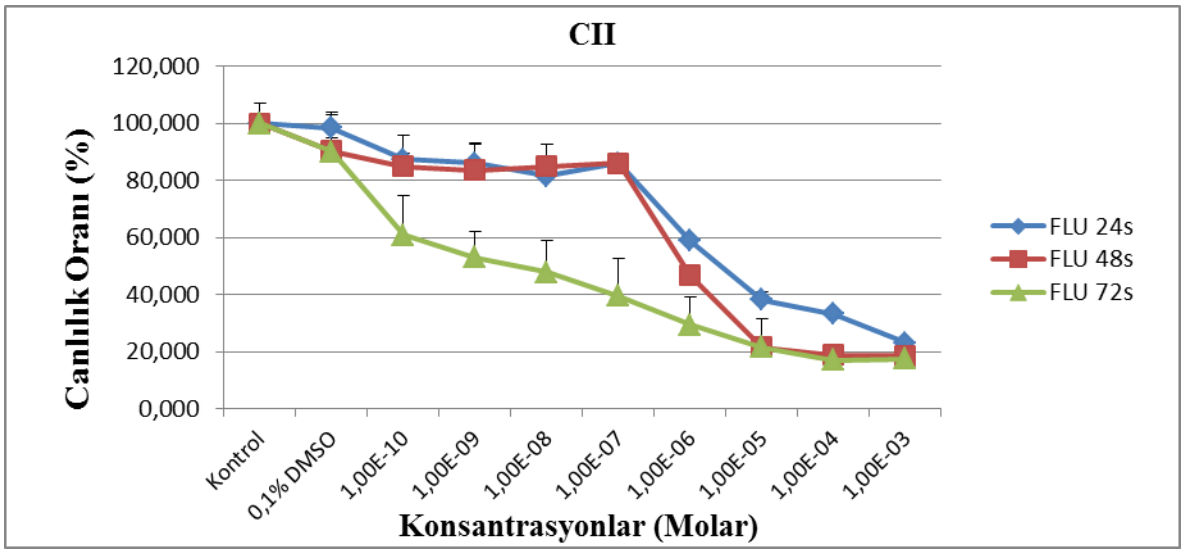
Grafik 4.4'de CII hücrelerinin, seri konsantrasyonlar halinde uygulanan DHA'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi. Bu verilere göre, DHA'nın özellikle 10^{-7} M konsantrasyonun uygulanmasıyla 24 saatlik inkübasyondan sonra %81,04 canlılık oranı görüldü. Bu konsantrasyondan sonra canlılık oranında belirgin bir düşüş görülürken, uygulanan en yüksek DHA konsantrasyonu olan 10^{-3} M'da %22,65 canlılık oranı belirlendi.



Şekil 4.4. CII hücrelerinin DHA'nın seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları

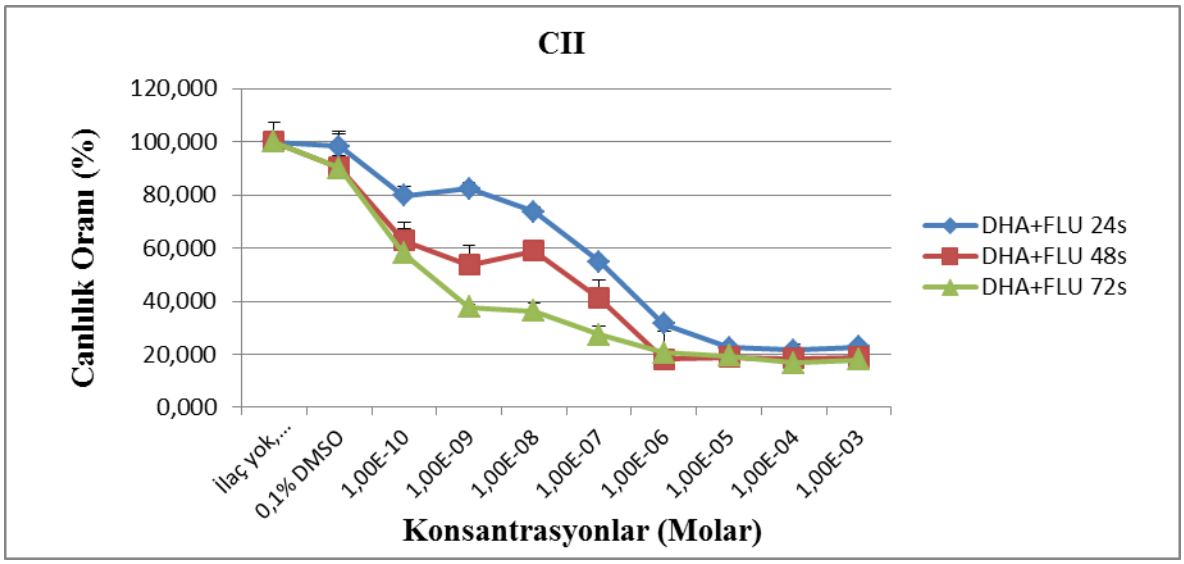
Şekil 4.5'de de CII hücrelerinin, seri konsantrasyonlar halinde uygulanan FLU'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi. FLU'nun özellikle 10^{-7} M konsantrasyonun

uygulanmasıyla 24 saatlik inkübasyondan sonra %86,05 canlılık oranı görüldü. Bu konsantrasyondan sonra canlılık oranında belirgin bir düşüş görülürken, uygulanan en yüksek FLU konsantrasyonu olan 10^{-3} M'da %22,96 canlılık oranı belirlendi.



Şekil 4.5. CII hücrelerinin FLU'nun seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları

Şekil 4.6'da ise CII hücrelerinin, seri konsantrasyonlar halinde uygulanan DHA+FLU'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi. DHA+FLU'nun özellikle 10^{-7} M konsantrasyonunda 24 saatlik inkübasyonundan sonra ise %54,90 canlılık oranı görülürken, uygulanan en yüksek DHA+FLU'nun birlikte konsantrasyonu olan 10^{-3} M'da %17,89 canlılık oranı belirlendi.

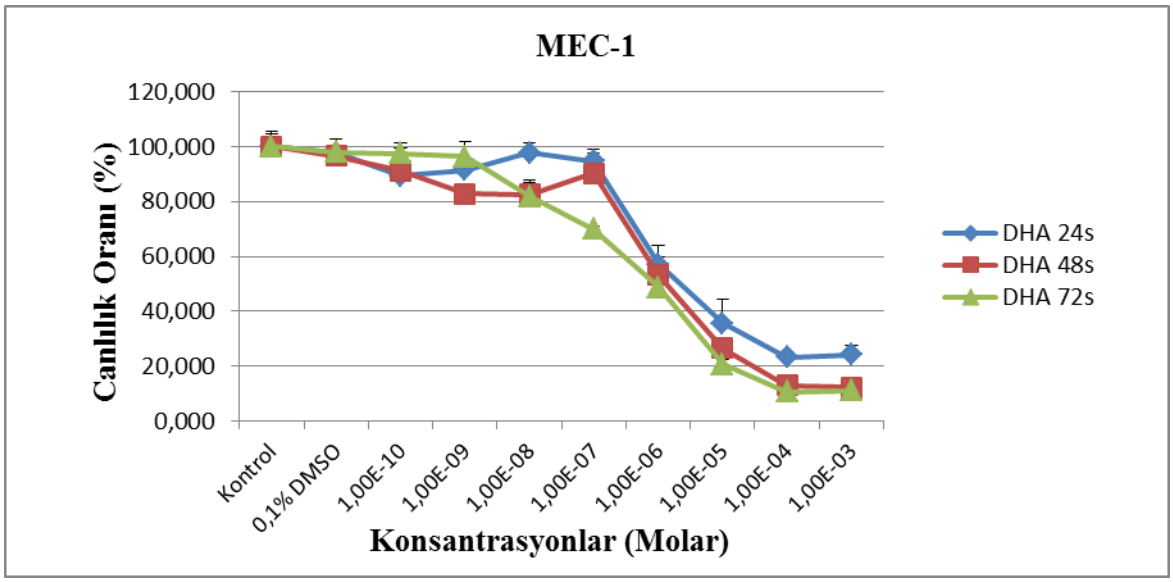


Şekil 4.6. CII hücrelerinin DHA+FLU'nun seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları

4.3.3. DHA ve FLU'nun MEC-1 hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri

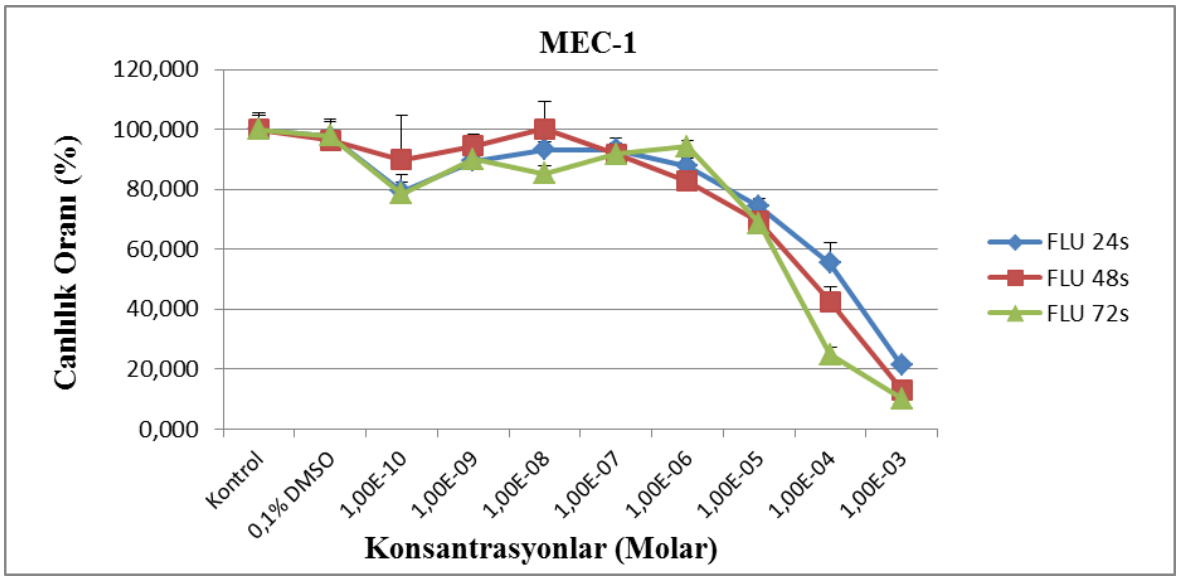
MEC-1 hücrelerinin, seri konsantrasyonlar halinde uygulanan DHA, FLU ve DHA+FLU'ya olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yöntemi sonuçlarına göre de MEC-1 hücrelerinin canlılık oranları, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda artan DHA, FLU ve DHA+FLU konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığı görüldü.

Şekil 4.7'de MEC-1 hücrelerinin, seri konsantrasyonlar halinde uygulanan DHA'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi. Bu verilere göre, DHA'nın özellikle 10^{-7} M konsantrasyonun uygulanmasıyla 24 saatlik inkübasyondan sonra %94,64 canlılık oranı görüldü. Bu konsantrasyondan sonra canlılık oranında belirgin bir düşüş görülürken, uygulanan en yüksek DHA konsantrasyonu olan 10^{-3} M'da %24,13 canlılık oranı belirlendi.



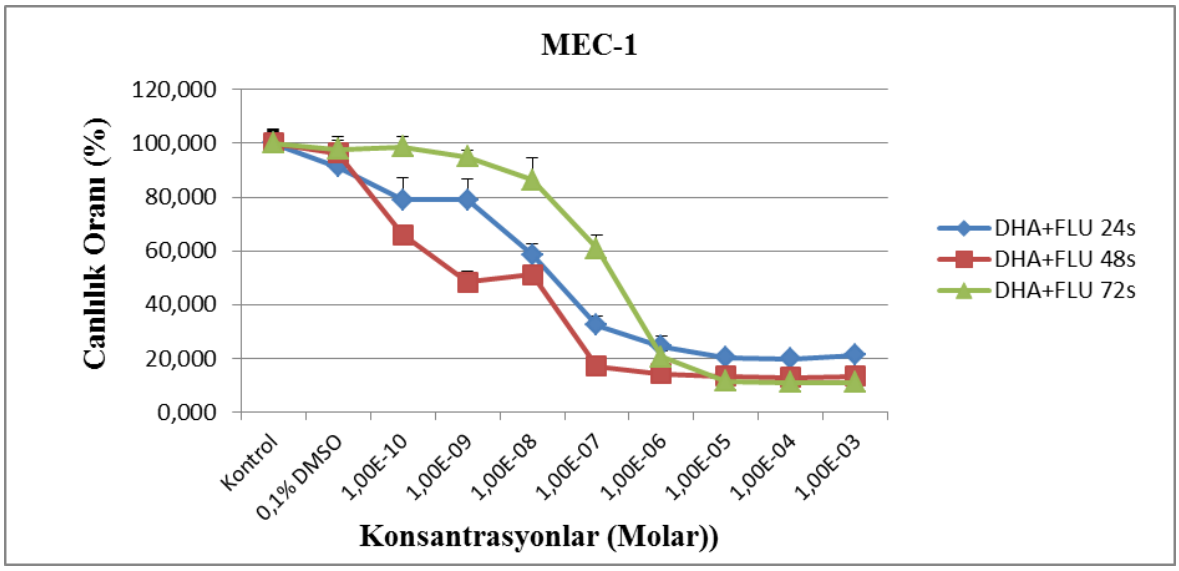
Şekil 4.7. MEC-1 hücrelerinin DHA'nın seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları

Şekil 4.8'de de MEC-1 hücrelerinin, seri konsantrasyonlar halinde uygulanan FLU'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi. Yine FLU'nun özellikle 10^{-7} M konsantrasyonun uygulanmasıyla 24 saatlik inkübasyondan sonra %93,22 canlılık oranı görüldü. Bu konsantrasyondan sonra canlılık oranında belirgin bir düşüş görülürken, uygulanan en yüksek FLU konsantrasyonu olan 10^{-3} M'da %21,39 canlılık oranı belirlendi.



Şekil 4.8. MEC-1 hücrelerinin FLU'nun seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları

Şekil 4.9'da ise MEC-1 hücrelerinin, seri konsantrasyonlar halinde uygulanan FLU'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi. DHA+FLU'nun özellikle 10^{-8} M konsantrasyonunda 24 saatlik inkübasyonundan sonra ise %78,91 canlılık oranı görülürken, bu konsantrasyondan sonra canlılık oranında belirgin bir düşüş belirlendi. Uygulanan en yüksek DHA+FLU'nun birlikte konsantrasyonuu olan 10^{-3} M'da %21,30 canlılık oranı belirlendi.



Şekil 4.9. MEC-1 hücrelerinin DHA+FLU'nun seri konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen canlılık oranları

4.4. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

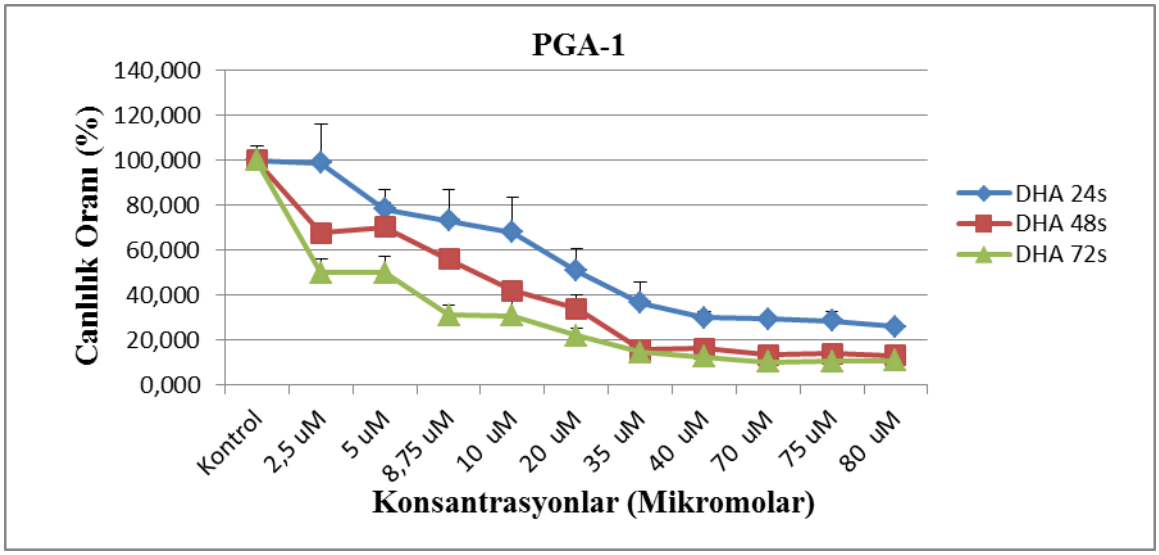
Hücrelere DHA ve FLU'nun ayrı ayrı ve DHA+FLU birlikte seri konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonucunda XTT yöntemiyle elde edilen verilere göre PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinin canlılık oranlarının artan DHA, FLU ve DHA+FLU konsantrasyonularına bağlı olarak düştüğü belirlendi. Tüm hücre serilerinde bu düşüşlerin özellikle 24 saatlik inkübasyon sonunda 10^{-7}M'dan itibaren olduğu görüldüğü için IC50 konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla yine 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına 10^4 hücre/kuyu olacak şekilde hücreler ekildi. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı ve kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı.

4.4.1. PGA-1 hücrelerine uygulanan DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} değerlerinin belirlenmesi

PGA-1 hücrelerine 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarda olacak şekilde DHA 24, 48 ve 72 saat süreler ile yeniden uygulandı. Süreler sonunda XTT yöntemi uygulanarak sonuçlar elde edildi. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı ve kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. Sürelerin sonunda XTT yöntemi yapılarak sonuçlar hücre kontrol grubuna göre ortalama % canlılık oranı olarak saptandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alındı ve standart sapma değerleri bulundu.

Şekil 4.10'da PGA-1 hücrelerinin, 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarda uygulanan DHA'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi.

Bu verilere göre PGA-1 hücrelerinde kullandığımız en yüksek DHA konsantrasyonu olan 80 uM'da hücre canlılığının 24 saatte yaklaşık %26, 48 saatte yaklaşık %13, 72 saatte ise yaklaşık %10 olduğu belirlendi. Sonuçlarımıza göre DHA için IC_{50} konsantrasyonunun PGA-1 hücrelerinde; 24 saat inkübasyon sonunda 22,82 uM, 48 saat inkübasyon sonunda 8,80 uM ve 72 saat inkübasyon sonunda 3,25 uM olduğu bulundu.

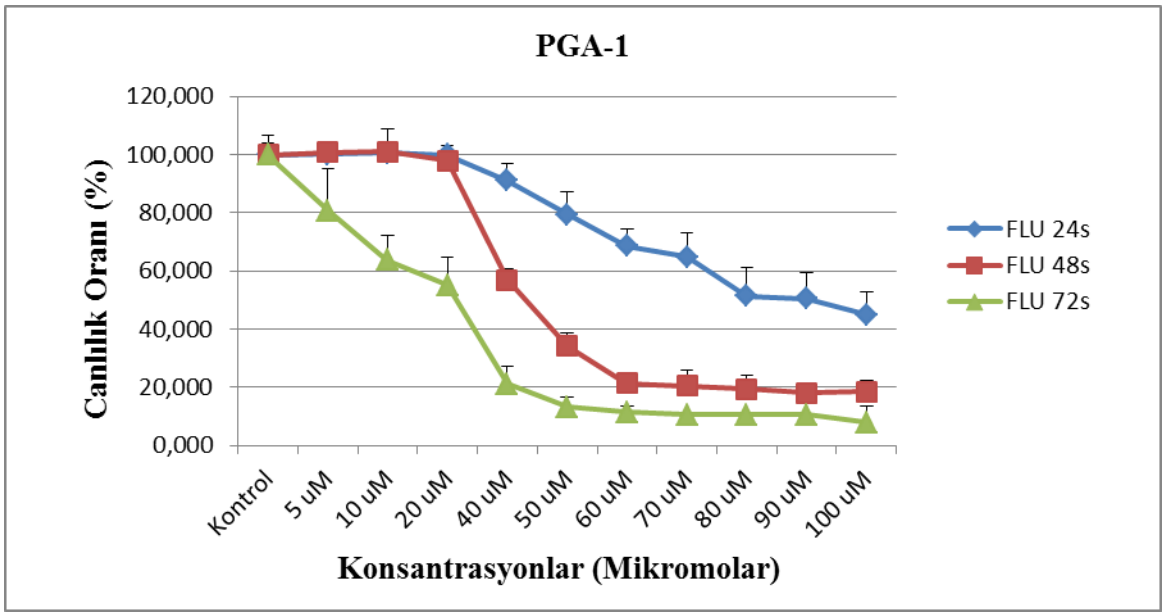


Şekil 4.10. PGA-1 hücrelerinin DHA'nın 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları yüzdesi

Yine PGA-1 hücrelerine 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarda olacak şekilde FLU 24, 48 ve 72 saat süreler ile yeniden uygulandı. Süreler sonunda XTT yöntemi uygulanarak sonuçlar elde edildi. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı ve kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. Sürelerin sonunda XTT yöntemi yapılarak sonuçlar hücre kontrol grubuna göre ortalama % canlılık oranı olarak saptandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alındı ve standart sapma değerleri bulundu.

Şekil 4.11'de PGA-1 hücrelerinin, 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarda uygulanan FLU'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi.

PGA-1 hücrelerinde kullandığımız en yüksek FLU konsantrasyonu olan 100 uM'da hücre canlılığının 24 saatte yaklaşık yaklaşık %45, 48 saatte yaklaşık %18, 72 saatte ise yaklaşık %8 olduğu belirlendi. Sonuçlarımıza göre FLU için IC_{50} konsantrasyonunun PGA-1 hücrelerinde; 24 saat inkübasyon sonunda 88,73 uM, 48 saat inkübasyon sonunda 42,18 uM ve 72 saat inkübasyon sonunda 17,33 uM olduğu bulundu.

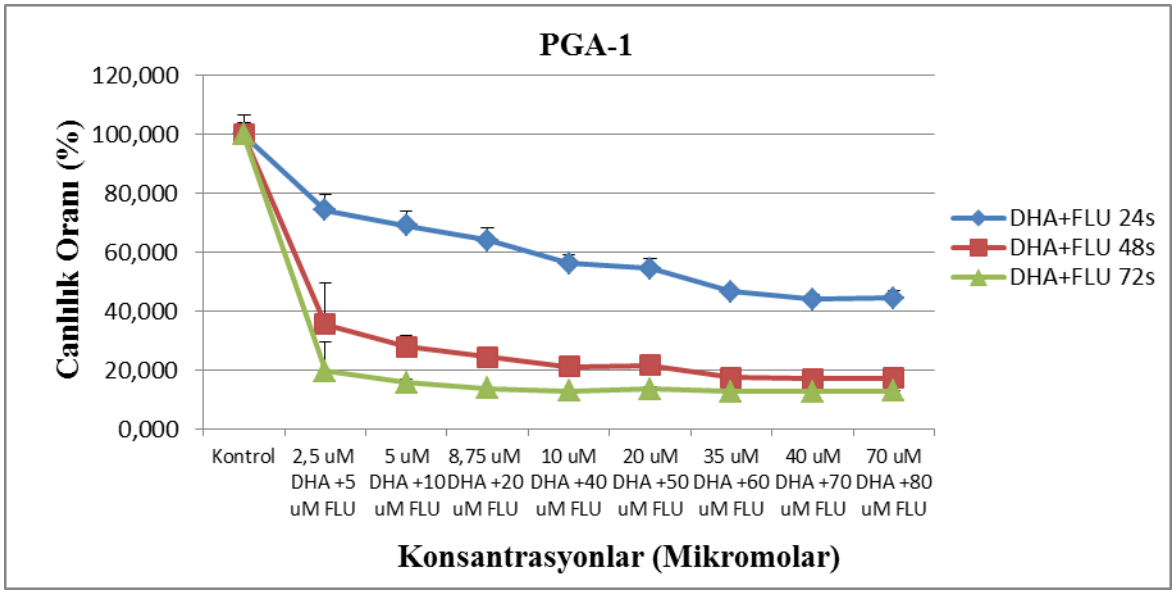


Şekil 4.11. PGA-1 hücrelerinin FLU'nun 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları yüzdesi

Bununla birlikte PGA-1 hücrelerine (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında olacak şekilde DHA ve FLU birlikte 24, 48 ve 72 saat süreler ile yeniden uygulandı. Süreler sonunda XTT yöntemi uygulanarak sonuçlar elde edildi. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı ve kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. Sürelerin sonunda XTT yöntemi yapılarak sonuçlar hücre kontrol grubuna göre ortalama % canlılık oranı olarak saptandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alındı ve standart sapma değerleri bulundu.

Şekil 4.12'de PGA-1 hücrelerinin (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında uygulanan DHA+ FLU'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi.

PGA-1 hücrelerinin canlılık oranlarının DHA ve FLU'nun birlikte kullanımı sonucunda da konsantrasyona bağlı olarak düştüğü gözlendi. PGA-1 hücrelerinde kullandığımız en yüksek DHA+FLU konsantrasyonu olan 70 uM DHA +80 uM FLU'da, hücre canlılığın 24 saatte yaklaşık %45, 48 saatte yaklaşık %17 ve 72 saatte yaklaşık %12 olduğu belirlendi. Sonuçlarımıza göre PGA-1 hücrelerinde 24 saat inkübasyon sonunda IC_{50} konsantrasyonunun yaklaşık 20 uM DHA + 50 uM FLU olduğu bulundu.

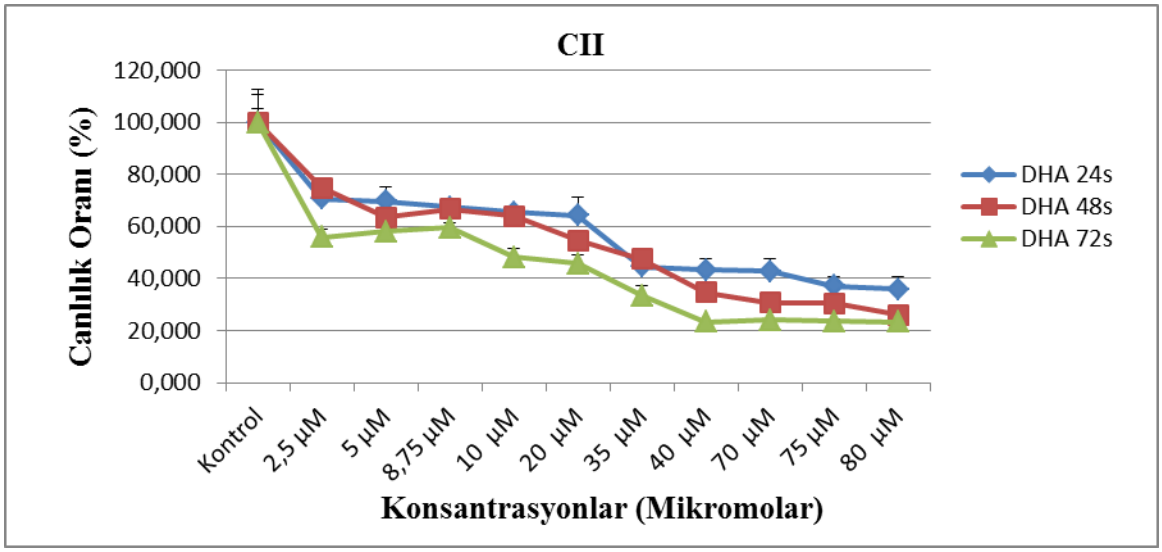


Şekil 4.12. PGA-1 hücrelerinin DHA+FLU'nun (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında uygulanarak 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları

4.4.2. CII hücrelerine uygulanan DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} değerlerinin belirlenmesi

CII hücrelerine 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarda olacak şekilde DHA 24, 48 ve 72 saat süreler ile yeniden uygulandı. Süreler sonunda XTT yöntemi uygulanarak sonuçlar elde edildi. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı ve kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. Sürelerin sonunda XTT yöntemi yapılarak sonuçlar hücre kontrol grubuna göre ortalama %canlılık oranı olarak saptandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alındı ve standart sapma değerleri bulundu. Şekil 4.13'de CII hücrelerinin, 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarda uygulanan DHA'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi.

CII hücrelerinde kullandığımız en yüksek DHA konsantrasyonu olan 80 uM'da hücre canlılığının 24 saatte yaklaşık %36, 48 saatte yaklaşık %26, 72 saatte ise yaklaşık %23 olduğu belirlendi. Sonuçlarımıza göre DHA için IC_{50} konsantrasyonunun CII hücrelerinde; 24 saat inkübasyon sonunda 30,25 uM, 48 saat inkübasyon sonunda 20,50 uM ve 72 saat inkübasyon sonunda 9,14 uM olduğu bulundu.

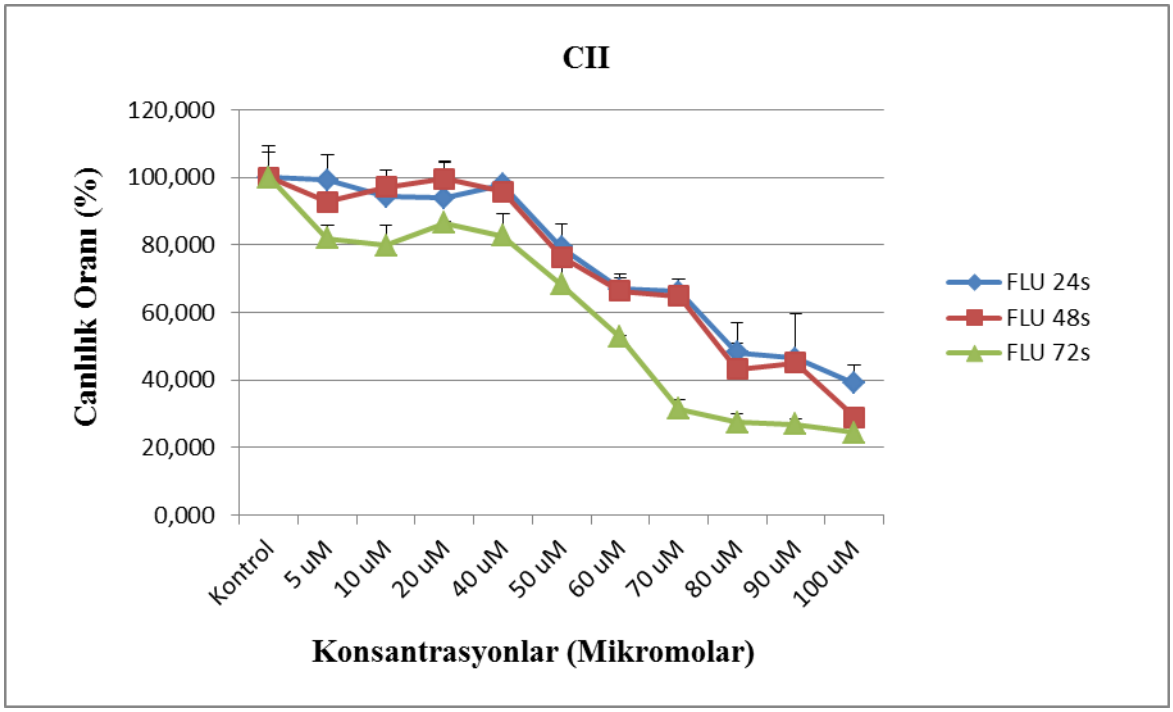


Şekil 4.13. CII hücrelerinin DHA'nın 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları

CII hücrelerine 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarda olacak şekilde FLU 24, 48 ve 72 saat süreler ile yeniden uygulandı. Süreler sonunda XTT yöntemi uygulanarak sonuçlar elde edildi. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı ve kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. Sürelerin sonunda XTT yöntemi yapılarak sonuçlar hücre kontrol grubuna göre ortalama % canlılık oranı olarak saptandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alındı ve standart sapma değerleri bulundu.

Şekil 4.14'de CII hücrelerinin, 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarda uygulanan FLU'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi.

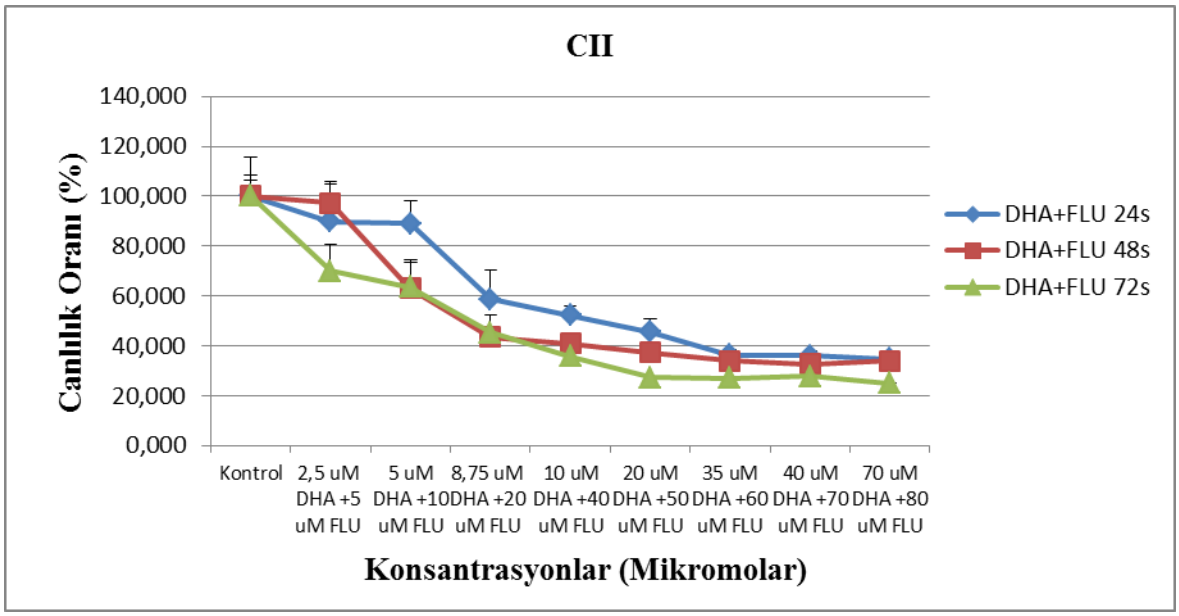
CII hücrelerinde de kullandığımız en yüksek FLU konsantrasyonu olan 100 uM'da hücre canlılığının 24 saatte yaklaşık yaklaşık %39, 48 saatte yaklaşık %29, 72 saatte ise yaklaşık %24 olduğu belirlendi. Sonuçlarımıza göre FLU için IC_{50} konsantrasyonunun CII hücrelerinde; 24 saat inkübasyon sonunda 83,80 uM, 48 saat inkübasyon sonunda 78,84 uM ve 72 saat inkübasyon sonunda 61 uM olduğu bulundu.



Şekil 4.14. CII hücrelerinin FLU'nun 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları

Bununla birlikte CII hücrelerine (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında olacak şekilde DHA ve FLU birlikte 24, 48 ve 72 saat süreler ile yeniden uygulandı. Süreler sonunda XTT yöntemi uygulanarak sonuçlar elde edildi. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı ve kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. Sürelerin sonunda XTT yöntemi yapılarak sonuçlar hücre kontrol grubuna göre ortalama %canlılık oranı olarak saptandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alındı ve standart sapma değerleri bulundu. Şekil 4.15'de CII hücrelerinin, (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında uygulanan DHA+ FLU'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi.

Buna göre CII hücrelerinin canlılık oranlarının DHA ve FLU'nun birlikte kullanımı sonucunda da konsantrasyona bağlı olarak düştüğü gözlendi. CII hücrelerinde kullandığımız en yüksek DHA+FLU konsantrasyonu olan 70 uM DHA + 80 uM FLU'da, hücre canlılığın 24 saatte yaklaşık %35, 48 saatte yaklaşık %34 ve 72 saatte yaklaşık %25 olduğu belirlendi. Sonuçlarımıza göre CII hücrelerinde 24 saat inkübasyon sonucunda IC_{50} konsantrasyonunun yaklaşık 10 uM DHA + 40 uM FLU olduğu bulundu.

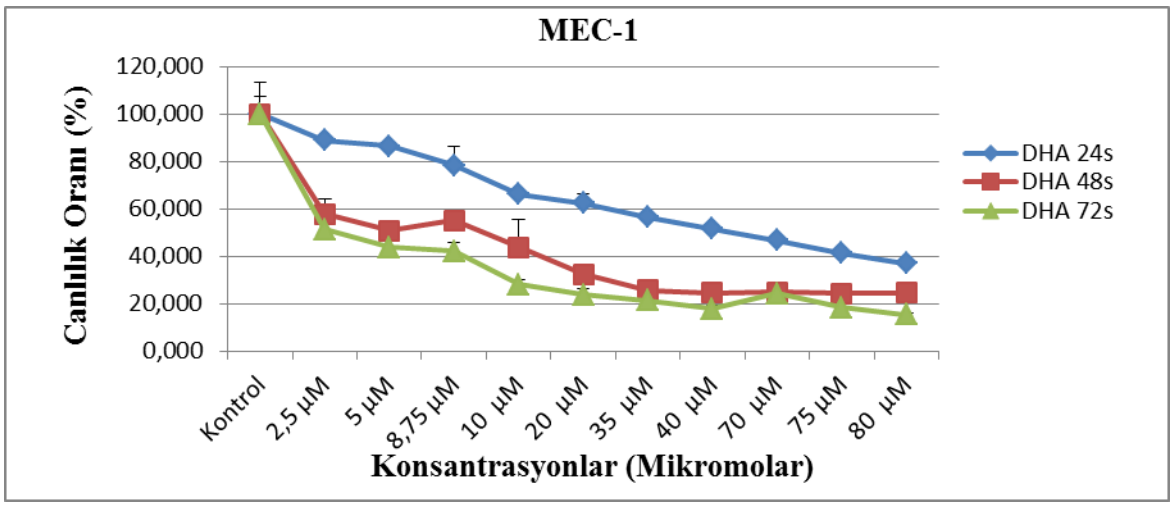


Şekil 4.15. CII hücrelerinin DHA+FLU'nun (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında uygulanarak 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları

4.4.3. MEC-1 hücrelerine uygulanan DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} değerlerinin belirlenmesi

MEC-1 hücrelerine 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarda olacak şekilde DHA 24, 48 ve 72 saat süreler ile yeniden uygulandı. Süreler sonunda XTT yöntemi uygulanarak sonuçlar elde edildi. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı ve kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. Sürelerin sonunda XTT yöntemi yapılarak sonuçlar hücre kontrol grubuna göre ortalama %canlılık oranı olarak saptandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alındı ve standart sapma değerleri bulundu. Şekil 4.16'da MEC-1 hücrelerinin, 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarıyla uygulanan DHA'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi.

MEC-1 hücrelerinde de kullandığımız en yüksek DHA konsantrasyonu olan 80 uM'da hücre canlılığının 24 saatte yaklaşık %37, 48 saatte yaklaşık %25, 72 saatte ise yaklaşık %15 olduğu belirlendi. Sonuçlarımıza göre DHA için IC_{50} konsantrasyonunun MEC-1 hücrelerinde; 24 saat inkübasyon sonunda 45,42 uM, 48 saat inkübasyon sonunda 7,10 uM ve 72 saat inkübasyon sonunda 1,83 uM olduğu belirlendi.

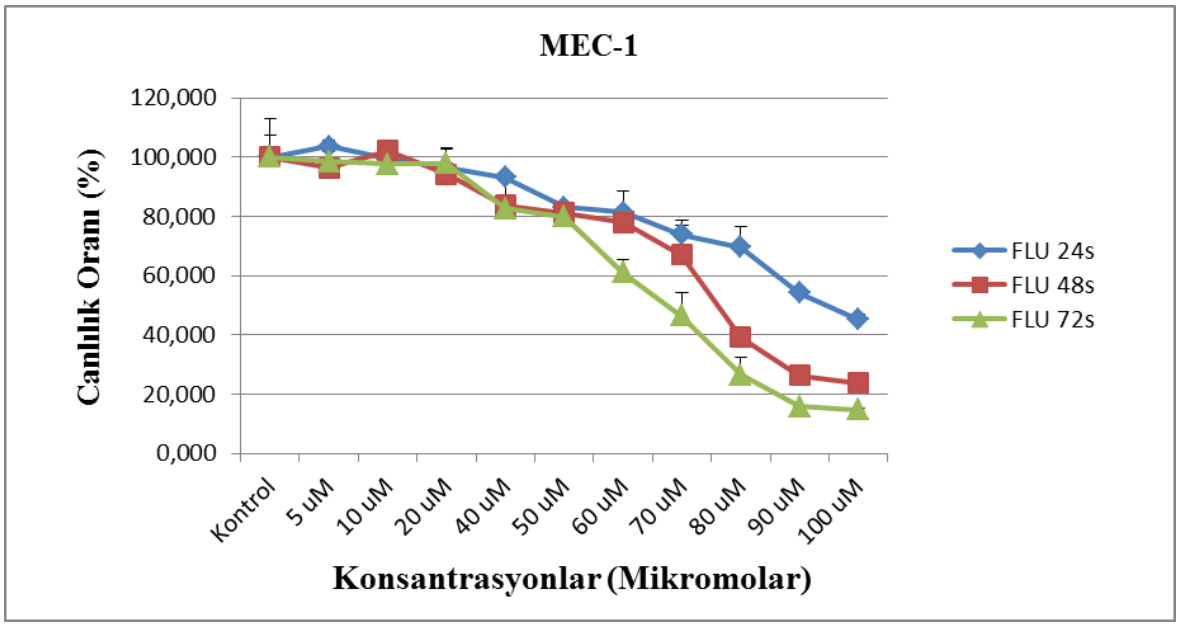


Şekil 4.16. MEC-1 hücrelerinin DHA'nın 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları

Yine MEC-1 hücrelerine 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarda olacak şekilde FLU 24, 48 ve 72 saat süreler ile yeniden uygulandı. Süreler sonunda XTT yöntemi uygulanarak sonuçlar elde edildi. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı ve kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. Sürelerin sonunda XTT yöntemi yapılarak sonuçlar hücre kontrol grubuna göre ortalama % canlılık oranı olarak aptandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alındı ve standart sapma değerleri bulundu.

Şekil 4.17'de MEC-1 hücrelerinin, 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarıyla uygulanan FLU'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi.

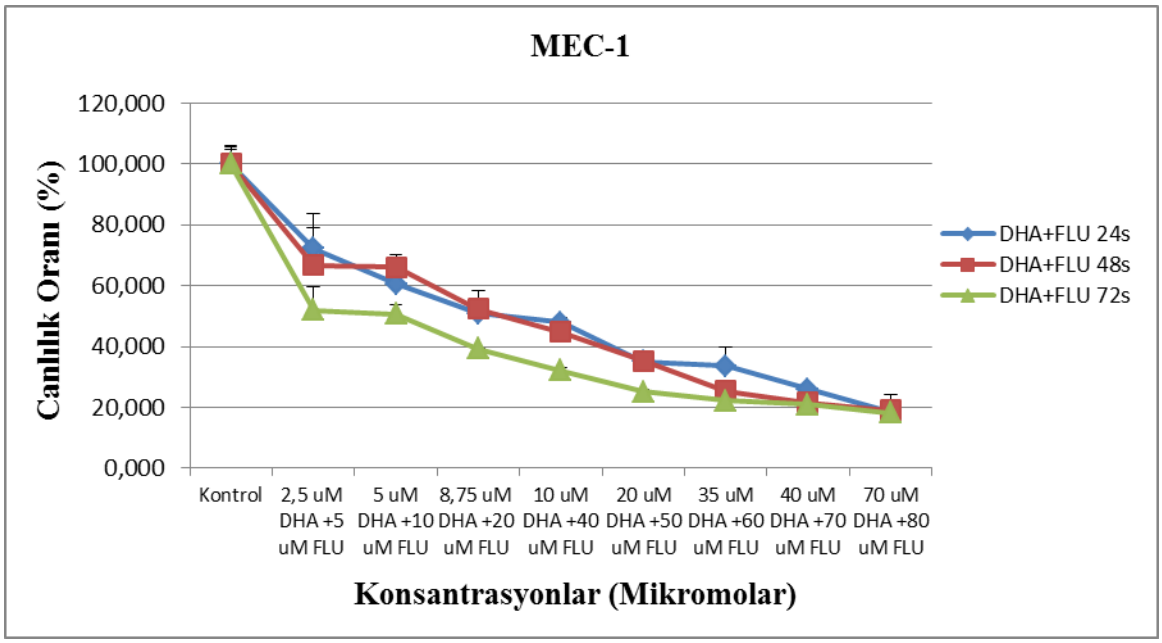
MEC-1 hücrelerinde kullandığımız en yüksek FLU konsantrasyonu olan 100 uM'da hücre canlılığının 24 saatte yaklaşık %44, 48 saatte yaklaşık %24, 72 saatte ise yaklaşık %15 olduğu belirlendi. Sonuçlarımıza göre FLU için IC_{50} konsantrasyonunun MEC-1 hücrelerinde; 24 saat inkübasyon sonunda 96,54 uM, 48 saat inkübasyon sonunda 75,52 uM ve 72 saat inkübasyon sonunda 65,70 uM olduğu bulundu.



Şekil 4.17. MEC-1 hücrelerinin FLU'nun 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları

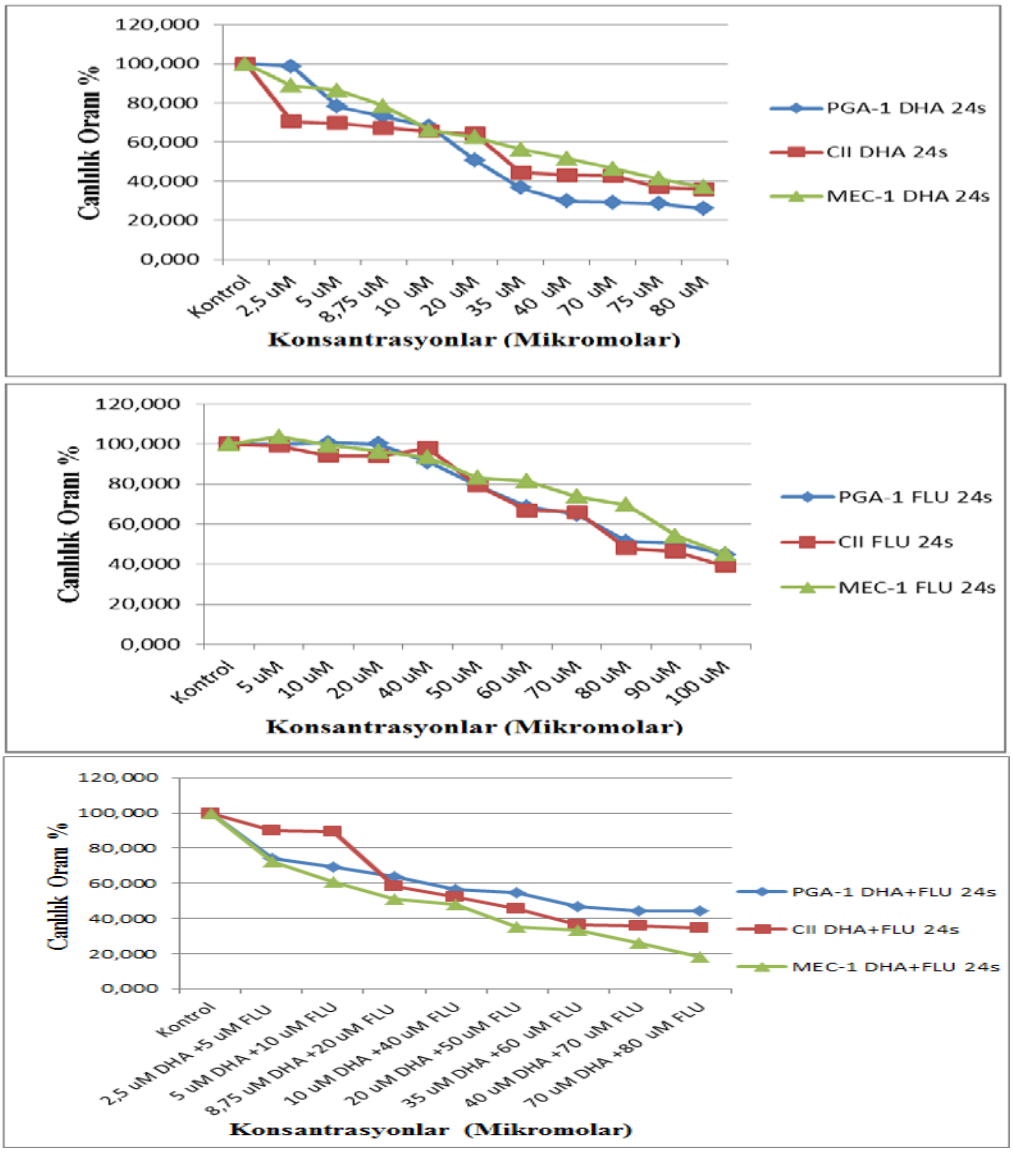
Bununla birlikte MEC-1 hücrelerine (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında olacak şekilde DHA ve FLU birlikte 24, 48 ve 72 saat süreler ile yeniden uygulandı. Süreler sonunda XTT yöntemi uygulanarak sonuçlar elde edildi. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı ve kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. Sürelerin sonunda XTT yöntemi yapılarak sonuçlar hücre kontrol grubuna göre ortalama %canlılık oranı olarak saptandı ve standart sapma değerleri bulundu. Şekil 4.18'de MEC-1 hücrelerinin, (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında uygulanan DHA+ FLU'ya 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda olan cevabının hücre canlılık oranları olarak ifade edilmesi için yapılan XTT yönteminin sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Yatay (x) eksende uygulanan molarite cinsinden konsantrasyonlar, dikey (y) eksende ise canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi.

MEC-1 hücrelerinin canlılık oranlarının DHA ve FLU'nun birlikte kullanımı sonucunda da konsantrasyona bağlı olarak düştüğü gözlendi. MEC-1 hücrelerinde kullandığımız en yüksek DHA+FLU konsantrasyonu olan 70 uM DHA + 80 uM FLU'da, hücre canlılığın 24 saatte yaklaşık %18, 48 saatte yaklaşık %19 ve 72 saatte yaklaşık %18 olduğu belirlendi. Sonuçlarımıza göre MEC-1 hücrelerinde 24 saat inkübasyon sonucunda IC_{50} konsantrasyonunun yaklaşık 8,75 uM DHA + 20 uM FLU olduğu bulundu.



Şekil 4.18. MEC-1 hücrelerinin DHA+FLU'nun (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında uygulanarak 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlılık oranları

Şekil 4.19'da da PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinin DHA'nın 2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM, FLU'nun 5-10-20-40-50-60-70-80-90 ve 100 uM ve DHA+FLU'nun (2,5uM DHA + 5uM FLU)- (70 uM DHA + 80 uM FLU) konsantrasyon aralığında uygulanmasıyla 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen % canlılık oranları karşılaştırıldı. Bu sonuçlara göre PGA-1 hücrelerinin, CII ve MEC-1 hücrelerine göre daha düşük konsantrasyonlardaki DHA konsantrasyonlarından etkilendiği görüldü. Bunun yanı sıra PGA-1 ve CII hücrelerinin, MEC-1'e göre göre daha düşük konsantrasyonlardaki FLU konsantrasyonlarından etkilendiği belirlendi. MEC-1 hücrelerinin ise, PGA-1 ve CII hücrelerine göre daha düşük konsantrasyonlardaki DHA + FLU birlikte konsantrasyonlarından etkilendiği gözlendi.



Şekil 4.19. PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinin DHA, FLU ve DHA+FLU ile 24 saat inkübasyonu sonundaki canlılık oranlarının karşılaştırılması

Özet olarak tüm bu sonuçlara göre her bir hücre için uygulanan DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} değerleri ve deney grupları Tablo 4.2'de belirtildi. Buna göre PGA-1 hücrelerine DHA 22,82 uM, FLU 88,73 uM ve DHA+FLU birlikte 20 uM + 50 uM konsantrasyonlarda uygulanmışken, CII hücrelerine DHA 30,25 uM, FLU 83,80 uM ve DHA+FLU birlikte 10 uM + 40 uM, MEC-1 hücrelerine de DHA 45,42 uM, FLU 96,54 uM ve DHA+FLU birlikte 8,75 uM DHA + 20 uM FLU uygulanmadı. Her bir hücre grubunun kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı.

Çizelge 4.2. Deney grupları ve KLL hücre serilerine uygulanan DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} değerleri

Deney Grupları	**KLL Hücre Serileri**		
	PGA-1 hücreleri	**CII hücreleri**	**MEC-1 hücreleri**
1) Kontrol	Ajan uygulanmadı	Ajan uygulanmadı	Ajan uygulanmadı
2) DHA	22,82 uM	30,25 uM	45,42 uM
3) FLU	88,73 uM	83,80 uM	96,54 uM
4) DHA +FLU	20 uM + 50 uM	10 uM + 40 uM	8,75 uM + 20 uM

4.5. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirmesi

Hücresel apoptoz, ölüm reseptörü ile ekstrinsik yolak veya intrinsik yolak üzerinden indüklenebilmektedir. Bcl-2 ailesi üyeleri ve kaspazlar apoptozun bilinen temel aracılarıdır. Bcl-2, Mcl-1 gibi anti-apoptotik proteinler apoptozu inhibe ederken, Bax gibi pro-apoptotik proteinler apoptozu uyarmaktadır [205]. Birçok doku ve hücre tipinde ifade edilen TCTP'nin de anti-apoptotik aktivitesi olduğu bildirilmektedir [17]. Bu bilgiler ışığında apoptoz ile ilişkili olduğu bilinen TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin mRNA ifade düzeylerini belirlemek için kantitatif Real-time PCR yöntemi ve LightCycler®480 cihazı kullanıldı. Bu amaçla PGA-1, CII ve MEC-1 hücreleri, 6 kuyucuklu düz tabanlı plaklarda $1x10^6$/mL hücre olacak şekilde sayılarak kültüre alındı. Daha sonra DHA ve FLU ayrı ayrı, DHA+FLU'nun XTT hücre canlılık deneyi sonucunda belirlenen IC_{50} konsantrasyonları hücrelere uygulandı ve kontrol grubu hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra her biri farklı RNA konsantrasyonuna sahip bu hücrelerden başlangıç miktarı 1000 ng olacak şekilde cDNA sentezi yapıldı. Elde edilen bu cDNA'larda TCTP ve Mcl-1 için bu genlere özgü primerler, FRET probları, LC FastStart DNA Master Plus HybProbe karışımı; Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 için ise yine bu genlere özgü primerler, UPL LNA probları, TaqMan Master karışımı ve tüm bu genlerin normalizasyonu için seçilen ABL1 genine özgü primer-prob karışımı kullanılarak çalışıldı. ABL1 geninin iç kontrol olarak kullanılmasının nedeni, bu genin

hematolojide “housekeeping” iç kontrol olarak uzlaşılan genlerden biri olmasıdır. Tüm bu cDNA örnekleri her bir gen için üçer kez çalışıldı. Ortalamalar ve standart sapmalar belirlendi.

Çalışmamızda göreceli gen ifadelenmesinin sonuçlarının değerlendirilmesi için “$2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi” kullanıldı. Buna göre;

$\Delta\Delta CT = [\ (\text{Örnek } \Delta CT)\text{ort.} - (\text{Kontrol } \Delta CT)\text{ort.}\ ]$

$\Delta\Delta CT = [(Ct_{\text{hedef gen örnek}} - Ct_{\text{housekeeping örnek}}) - (Ct_{\text{hedef gen kontrol}} - Ct_{\text{housekeeping kontrol}})$

Hedef gen mRNA miktarı = $2^{-\Delta\Delta CT}$

Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade etmektedir. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔCt değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Hesaplamalar, “SABiosciences QIAGEN” web portalında Real-Time PCR data analizi kullanılarak yapıldı.

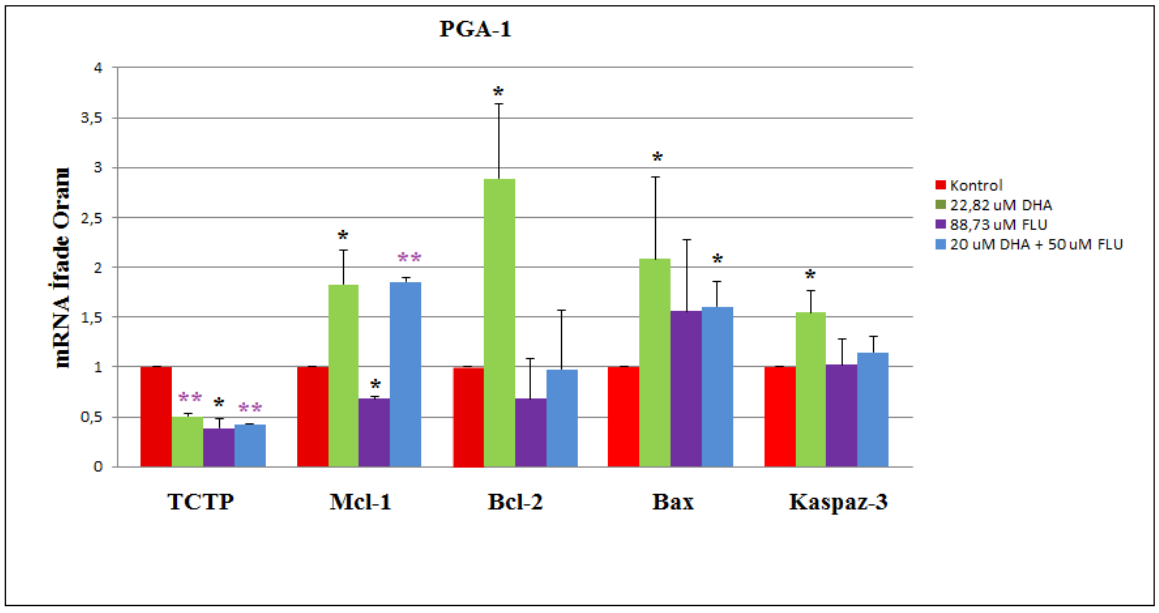
4.6. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırması

PGA-1, MEC1 ve CII hücrelerine DHA ve FLU ayrı ayrı, DHA + FLU’nun belirlenen IC_{50} konsantrasyonları uygulanmasından sonra TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin ifade düzeylerinin konsantrasyona bağlı olarak karşılaştırmalı değerlendirmeleri yapıldı. Bu genlerin mRNA ifade düzeylerini belirlemek için kantitatif Real-time PCR yöntemi kullanıldı.

4.6.1. PGA-1 hücrelerinde gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması

PGA-1 hücrelerine; belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 22,82 uM olan DHA, belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 88,73 uM olan FLU ve ve 20 uM DHA + 50 uM FLU birlikte uygulandıktan sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 genlerinin ifade düzeylerine etkilerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplanması sonucunda, anti-apoptotik özellikteki TCTP mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma

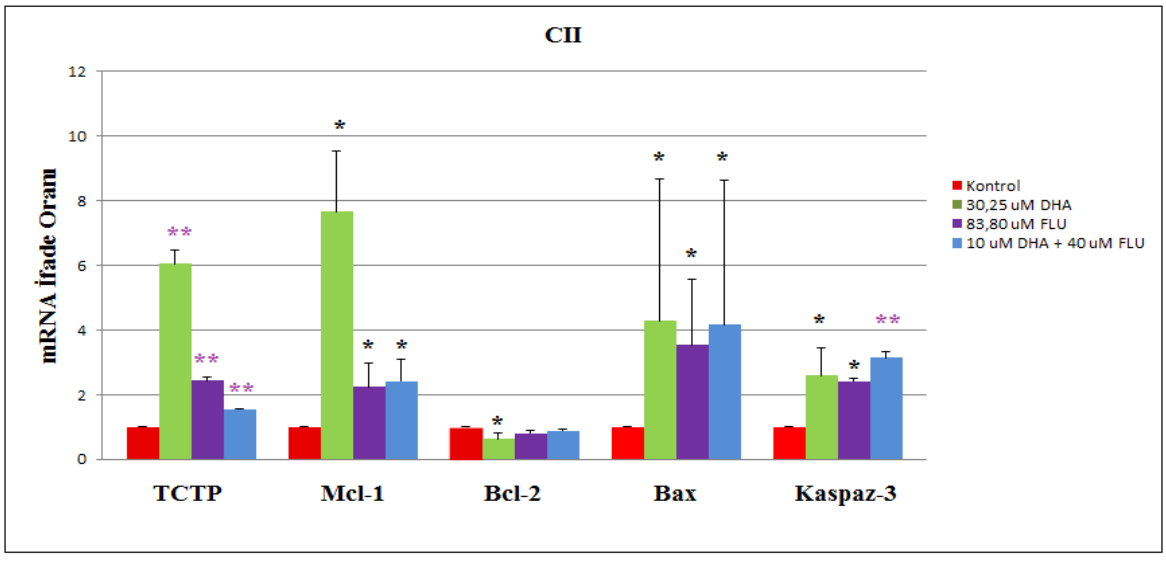
(p<0,001), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde azalma (p<0,05) ve DHA + FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde azalma (p<0,001) belirlendi. Anti-apoptotik özellikteki Mcl-1 mRNA ifade düzeylerinde ise kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma (p<0,05), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde azalma (p<0,05) ve DHA + FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma (p<0,001) saptandı. Yine anti-apoptotik özellikteki Bcl-2 mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma (p<0,05), FLU tek başına ve DHA+FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı gözlendi (p>0,05). Apoptotik özellikte olan Bax mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA ve DHA+FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma (p<0,05), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı bulundu (p>0,05). Kaspaz-3 mRNA ifade düzeylerinde ise kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma (p<0,05), FLU tek başına ve DHA+FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı belirlendi (p>0,05) (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. PGA-1 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak DHA, FLU ve bu ajanların birlikte uygulanması sonrasında TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri ABL1 mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi (*; p<0.05) (**; p<0.001)

4.6.2. CII hücrelerinde gen ifade düzylerinin karşılaştırılması

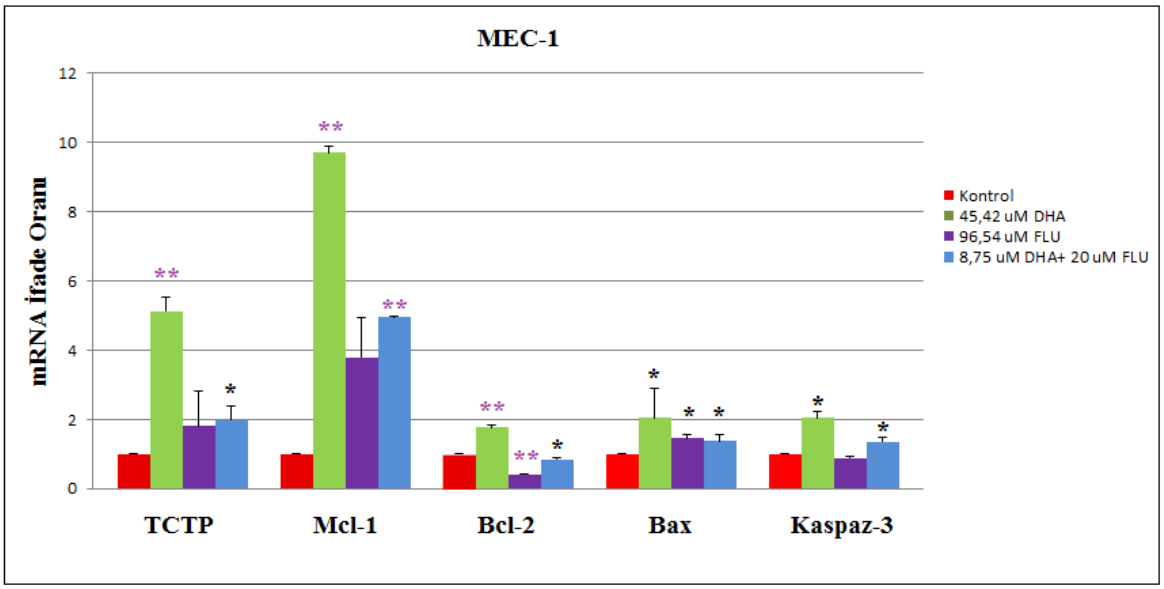
CII hücrelerine; belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 30,25 uM olan DHA, belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 83,80 uM olan FLU ve ve 10 uM DHA + 40 uM FLU birlikte uygulandıktan sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 genlerinin ifade düzeylerine etkilerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplanması sonucunda, anti-apoptotik özellikteki TCTP mRNA ifade düzeylerinde DHA ve FLU ayrı ayrı ve DHA + FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma belirlendi ($p<0,001$). Anti-apoptotik özellikteki Mcl-1 mRNA ifade düzeylerinde ise DHA ve FLU ayrı ayrı ve DHA + FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda kontrole göre anlamlı ölçüde artma saptandı ($p<0,05$). Yine anti-apoptotik özellikteki Bcl-2 mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde azalma ($p<0,05$) belirlendi. FLU tek başına ve DHA+FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı gözlendi ($p>0,05$). Apoptotik özellikte olan Bax mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA ve FLU ayrı ayrı ve DHA + FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma belirlendi ($p<0,05$). Kaspaz-3 mRNA ifade düzeylerinde ise kontrole göre, DHA ve FLU tek başına uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma ($p<0,05$), DHA+FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda da anlamlı ölçüde artma saptandı ($p<0,001$) (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. CII hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak DHA, FLU ve bu ajanların birlikte uygulanması sonrasında TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri ABL1 mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi (*; $p<0.05$) (**; $p<0.001$)

4.6.3. MEC-1 hücrelerinde gen ifade düzylerinin karşılaştırılması

MEC-1 hücrelerinde belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 45,42 uM olan DHA, belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 96,54 uM olan FLU ve ve 8,75 uM DHA + 20 uM FLU birlikte uygulandıktan sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 genlerinin ifade düzeylerine etkilerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplanması sonucunda, anti-apoptotik özellikteki TCTP mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma ($p<0,001$), FLU uygulanmasından sonra istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$), DHA + FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma belirlendi ($p<0,05$). Anti-apoptotik özellikteki Mcl-1 mRNA ifade düzeylerinde ise kontrole göre, DHA tek başına ve DHA + FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma ($p<0,001$), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı gözlendi ($p>0,05$). Yine anti-apoptotik özellikteki Bcl-2 mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma ($p<0,001$), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde azalma ($p<0,001$) ve DHA + FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda da anlamlı ölçüde azalma ($p<0,05$) saptandı. Apoptotik özellikte olan Bax mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA, FLU ve DHA+FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma belirlendi ($p<0,05$). Kaspaz-3 mRNA ifade düzeylerinde ise kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma ($p<0,05$), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$) ve DHA+FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma ($p<0,05$) saptandı (**Şekil** 4.22).



Şekil 4.22. MEC-1 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak DHA, FLU ve bu ajanların birlikte uygulanması sonrasında TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genin ifade düzeyleri ABL1 mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi (*; $p<0.05$) (**;$p<0.001$)

4.7. Akım sitometri ile Apoptoz Tayini

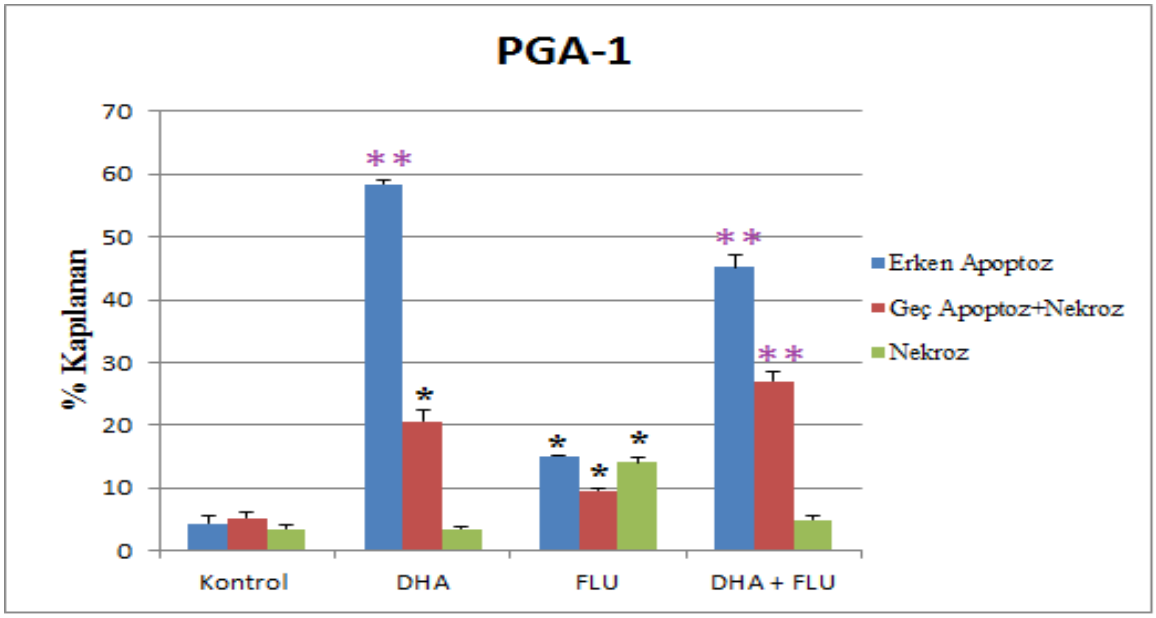
Fosfolipidlerden biri olan Fosfatidilserin'in hücre yüzeyine çıkması, apoptozda görülen erken bir olaydır ve apoptozu saptamak için kullanılabilmektedir. Apoptoz süresince fosfatidilserin, plazma membranının sitoplazmik yüzeyinden hücre yüzeyine yer değiştirmektedir. Annexin V'in, fosfatidilserin için güçlü bir Ca^{+2} bağımlı affinitesi bulunmaktadır ve bu yüzden FITC işaretli Anneksin V antikoru kullanılarak apoptotik hücre görünür hale getirilebilmektedir. Geç apoptotik ve nekrotik hücreleri saptamak için de vital bir boya olan Propidyum iyodür (PI) kullanılmaktadır. Bozulmamış membranı olan canlı hücreler PI'yı içeri almazlar, oysaki ölü ve hasarlanmış hücre membranları PI'a geçirgendir. Bu yüzden, canlı olan hücreler hem Annexin V hem PI negatif ([Annexin V -/PI -]), erken apoptozdaki hücreler Annexin V pozitif ve PI negatif ([Annexin V+ / PI -]), geç apoptozdaki veya ölmüş hücreler hem Annexin V hem PI pozitif iken ([Annexin V+ / PI +]), nektorik hücreler Annexin V negatif ve PI pozitiftir ([Annexin V- / PI +]) [206].

Buradan yola çıkılarak çalışmamızda PGA-1, CII ve MEC-1 KLL hücre serilerine DHA ve FLU ayrı ayrı, DHA+FLU'nun birlikte uygulanmasının apoptoz üzerine etkilerini belirlemek amacıyla hücreler, 6 kuyucuklu kültür plaklarında her bir kuyuya 10^6 hücre gelecek şekilde sayılarak kültüre alındı. Daha sonra ajanların XTT hücre canlılık deneyi

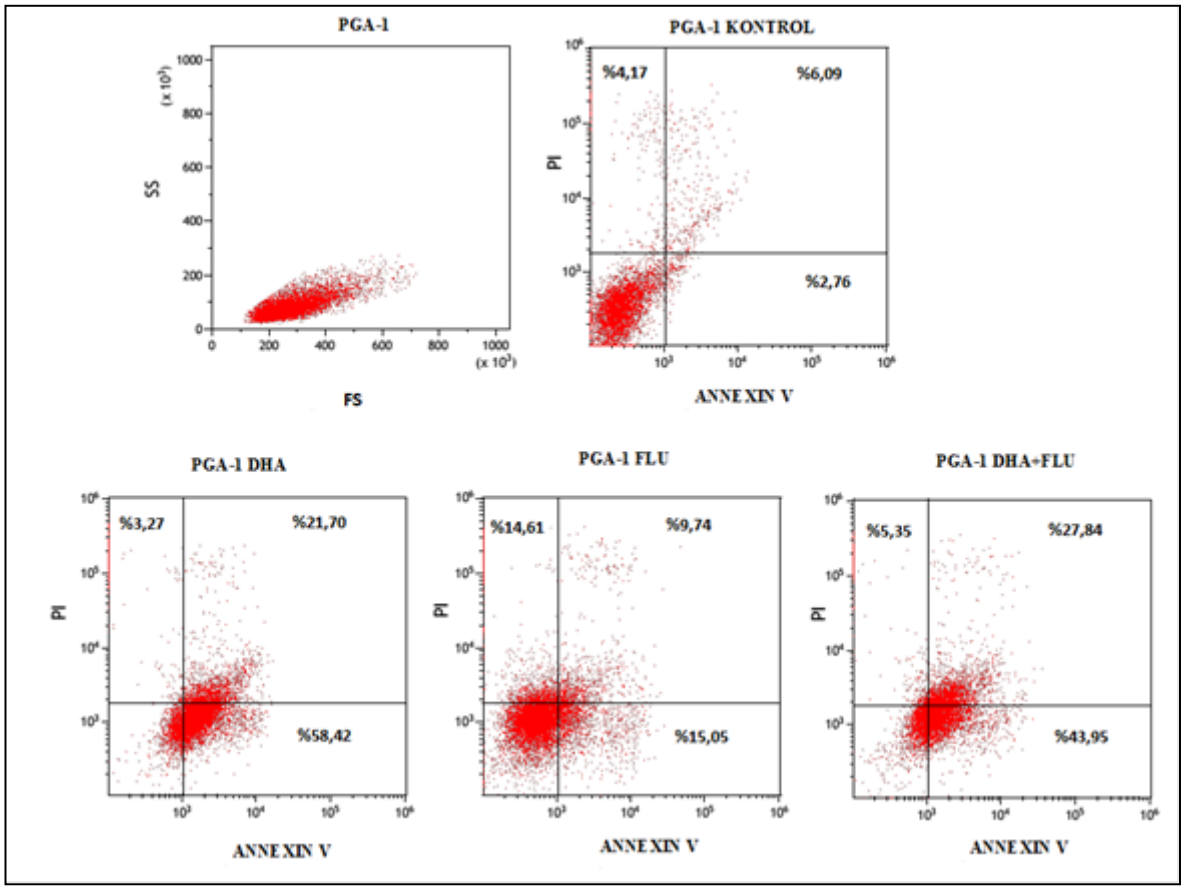
sonucunda belirlenen IC_{50} konsantrasyonları hücrelere uygulandı ve 24 saat inkübasyondan sonra bu ajanların apoptoz üzerine etkileri Annexin V-FITC ve Propidium İyodür ile aynı zamanda boyanarak akım sitometri ile incelendi. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı. Beckman Coulter Navios cihazında ve Kaluza yazılım programında lenfosit hücreleri etrafında oluşturulan kapılama ile hücre dağılımı, nokta grafikler (Dot plot) kullanılarak incelendi.

4.7.1. PGA-1 hücrelerinde akım sitometri ile apoptoz tayini

PGA-1 kontrol hücrelerinde ortalama %4,31 oranında erken apoptoz, ortalama %5,14 oranında geç apoptoz+nekroz ve ortalama %3,46 oranında nekroz olduğu gözlendi. PGA-1 hücrelerine belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 22,82 uM olan DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ortalama %58,42 oranında erken apoptoz, ortalama % 20,64 oranında geç apoptoz+nekroz ve %3,45 oranında nekroz saptandı. Bu verilere göre, PGA-1 hücrelerine DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda kontrol ile karşılaştırıldığında, erken apoptoz ($p<0,001$) ve geç apoptoz+nekroz oranında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi. Yalnız nekroz oranında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p>0,05$). Yine belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 88,73 uM olan FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ortalama %15,09 oranında erken apoptoz, ortalama %9,49 oranında geç apoptoz+nekroz ve %13,99 oranında nekroz gözlendi. Bu verilere göre de, PGA-1 hücrelerine FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda kontrol ile karşılaştırıldığında erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptandı ($p<0,05$). Ayrıca 20 uM DHA + 50 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ortalama %45,23 oranında erken apoptoz, ortalama %27,03 oranında geç apoptoz+nekroz ve %4,84 oranında nekroz gözlendi. Bu verilere göre ise, PGA-1 hücrelerine DHA+FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda kontrol ile karşılaştırıldığında erken apoptoz ve geç apoptoz+nekroz oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ($p<0,05$), yalnız nekroz oranında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (**Şekil** 4.23, Şekil 4.24).



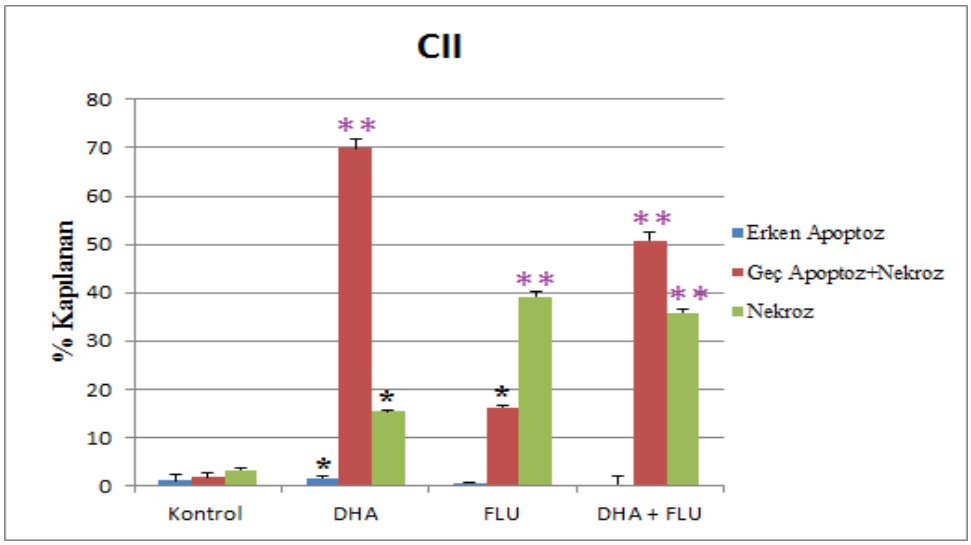
Şekil 4.23. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda PGA-1 hücrelerinin akım sitometride Anneksin V-FITC/PI ile analiz edilen apoptoz oranlarının karşılaştırılması (*; $p<0.05$) (**;$p<0.001$)



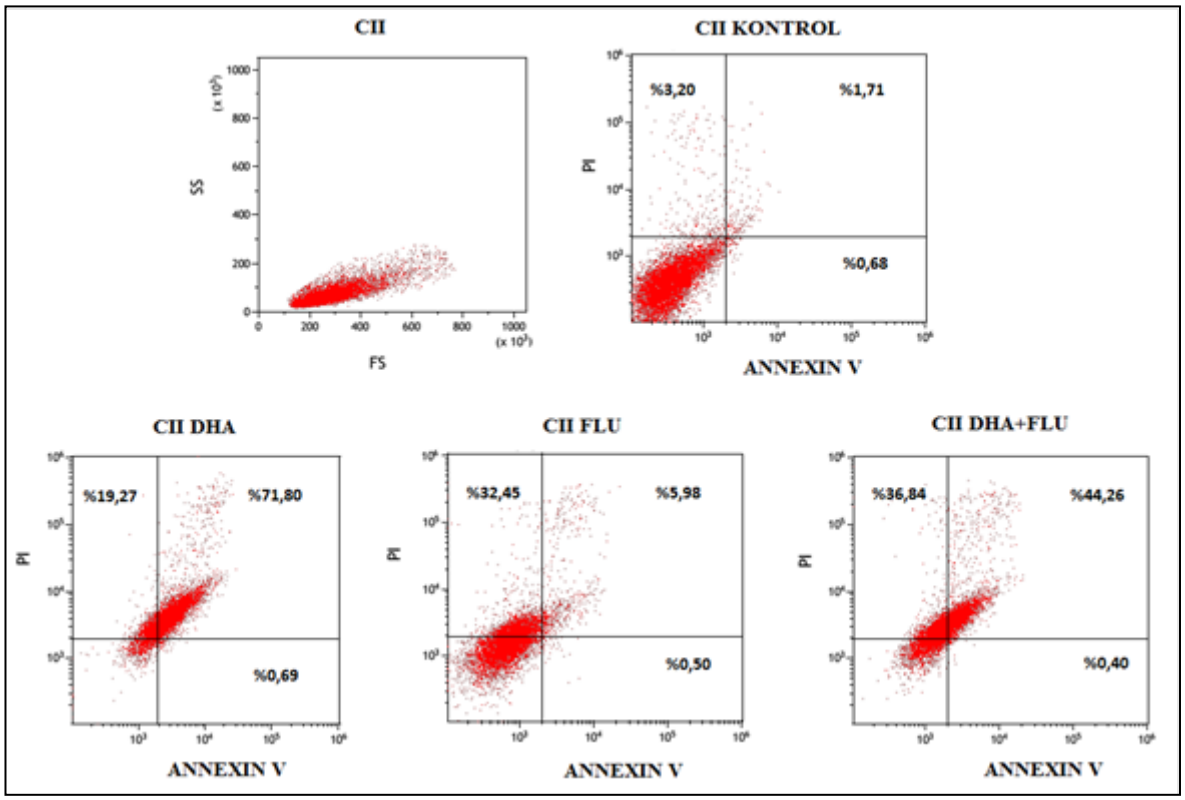
Şekil 4.24. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda PGA-1 hücrelerinin akım sitometride Anneksin V-FITC/PI ile apoptoz analizleri

4.7.2. CII hücrelerinde akım sitometri ile apoptoz tayini

CII kontrol hücrelerinde ise ortalama %1,05 oranında erken apoptoz, ortalama %1,8 oranında geç apoptoz+nekroz ve ortalama %3,21 oranında nekroz olduğu gözlendi. CII hücrelerine belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 30,25 uM olan DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ortalama %1,61 oranında erken apoptoz, ortalama %69,88 oranında geç apoptoz+nekroz ve %15,38 oranında nekroz saptandı. Bu verilere göre, CII hücrelerine DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda kontrol ile karşılaştırıldığında erken apoptoz ($p<0,05$), geç apoptoz+nekroz ($p<0,001$) ve nekroz ($p<0,05$) oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi. Yine belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 83,80 uM olan FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ise ortalama %0,56 oranında erken apoptoz, ortalama %16,18 oranında geç apoptoz+nekroz ve %39,18 oranında nekroz gözlendi. Bu verilere göre de, CII hücrelerine FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda kontrol ile karşılaştırıldığında erken apoptoz oranında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$), geç apoptoz+nekroz ($p<0,05$) ve yalnız nekroz ($p<0,001$) oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi. Ayrıca 10 uM DHA + 40 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ortalama %0,24 oranında erken apoptoz, ortalama %50,79 oranında geç apoptoz+nekroz ve %35,76 oranında nekroz saptandı. Bu verilere göre ise, CII hücrelerine DHA+FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda kontrol ile karşılaştırıldığında erken apoptoz oranında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$), yine geç apoptoz+nekroz ve yalnız nekroz oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p<0,001$). (**Şekil** 4.25, Şekil 4.26).



Şekil 4.25. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda CII hücrelerinin akım sitometride Anneksin V-FITC/PI ile analiz edilen apoptoz oranlarının karşılaştırılması (*; $p<0.05$) (**;$p<0.001$)

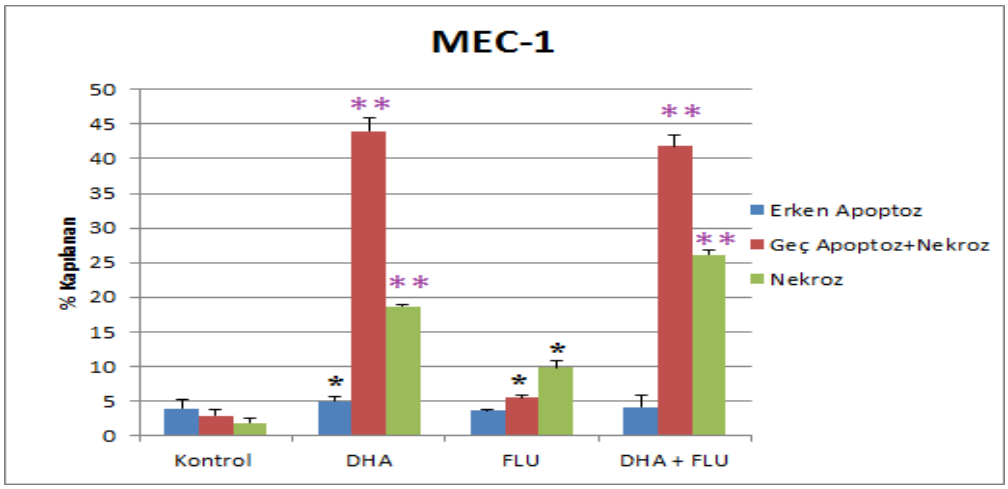


Şekil 4.26. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda CII hücrelerinin akım sitometride Anneksin V-FITC/PI ile apoptoz analizleri

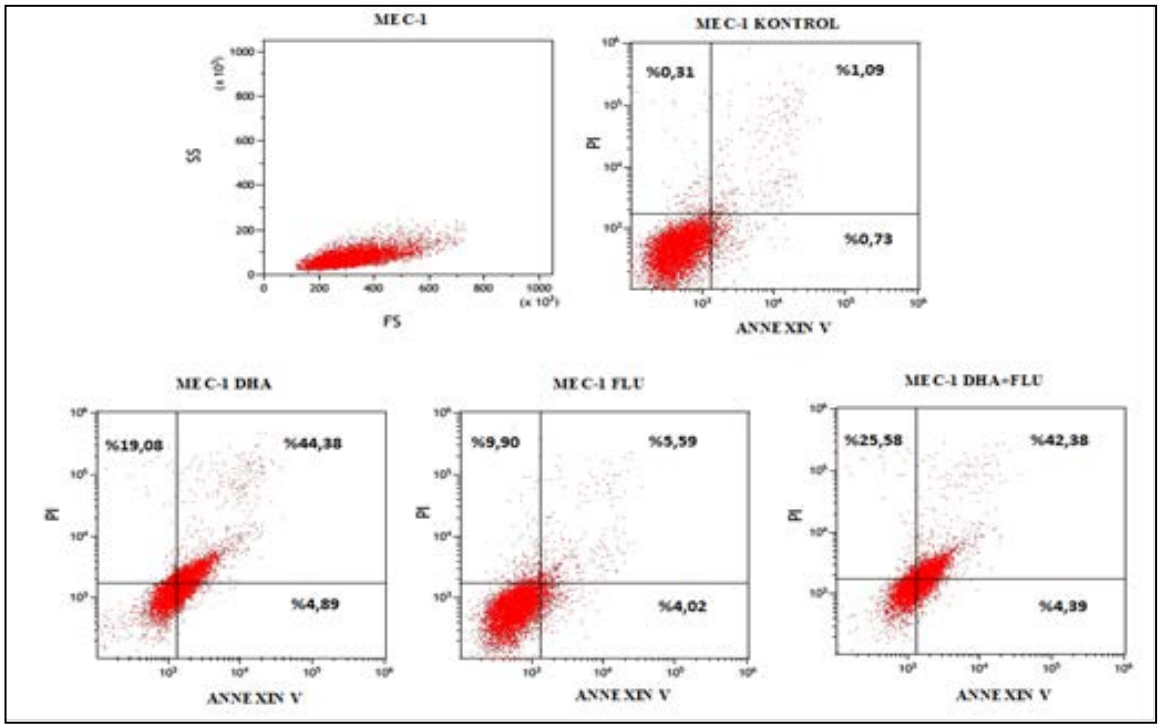
4.7.3. MEC-1 hücrelerinde akım sitometri ile apoptoz tayini

MEC-1 kontrol hücrelerinde ise ortalama %3,93 oranında erken apoptoz, ortalama %2,85 oranında geç apoptoz+nekroz ve ortalama %1,84 oranında nekroz olduğu gözlendi. MEC-1 hücrelerine belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 45,42 uM olan DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ortalama %5 oranında erken apoptoz, ortalama %43,94 oranında geç apoptoz+nekroz ve %18,67 oranında nekroz saptandı. Bu verilere göre, MEC-1 hücrelerine DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda kontrol ile karşılaştırıldığında erken apoptoz ($p<0,05$), geç apoptoz ve nekroz ($p<0,001$) oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi. Yine belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 96,54 uM olan FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ise ortalama %3,63 oranında erken apoptoz, ortalama %5,42 oranında geç apoptoz+nekroz ve %9,82 oranında nekroz gözlendi. Bu verilere göre de, MEC-1 hücrelerine FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda kontrol ile karşılaştırıldığında erken apoptoz oranında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$), geç apoptoz+nekroz ($p<0,05$) ve yalnız nekroz ($p<0,001$) oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptandı. Ayrıca 8,75 uM DHA + 20 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ortalama %4,07

oranında erken apoptoz, ortalama %41,85 oranında geç apoptoz+nekroz ve %26,11 oranında nekroz gözlendi. Bu verilere göre ise, MEC-1 hücrelerine DHA+FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda kontrol ile karşılaştırıldığında erken apoptoz oranında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı (p>0,05), geç apoptoz+nekroz ve yalnız nekroz oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu (p<0,001) (Şekil 4.27, Şekil 4.28).



Şekil 4.27. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda MEC-1 hücrelerinin akım sitometride Anneksin V-FITC/PI ile analiz edilen apoptoz oranlarının karşılaştırılması (*; p<0.05) (**;p<0.001)



Şekil 4.28. DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda MEC-1 hücrelerinin akım sitometride Anneksin V-FITC/PI ile apoptoz analizleri

4.8. Akım Sitometri ile Protein İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması

PGA-1, MEC1 ve CII hücrelerine DHA ve FLU ayrı ayrı, DHA + FLU birlikte uygulanmasından sonra TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin konsantrasyona bağlı olarak karşılaştırmalı değerlendirmeleri için floresan yoğunluğuna bağlı olarak süspansiyon halindeki hücrelerin büyüklüğüne ve granülaritesine göre tek hücre seviyesinde kantitatif ölçüm yapan bir sistem olan akım sitometri kullanıldı.

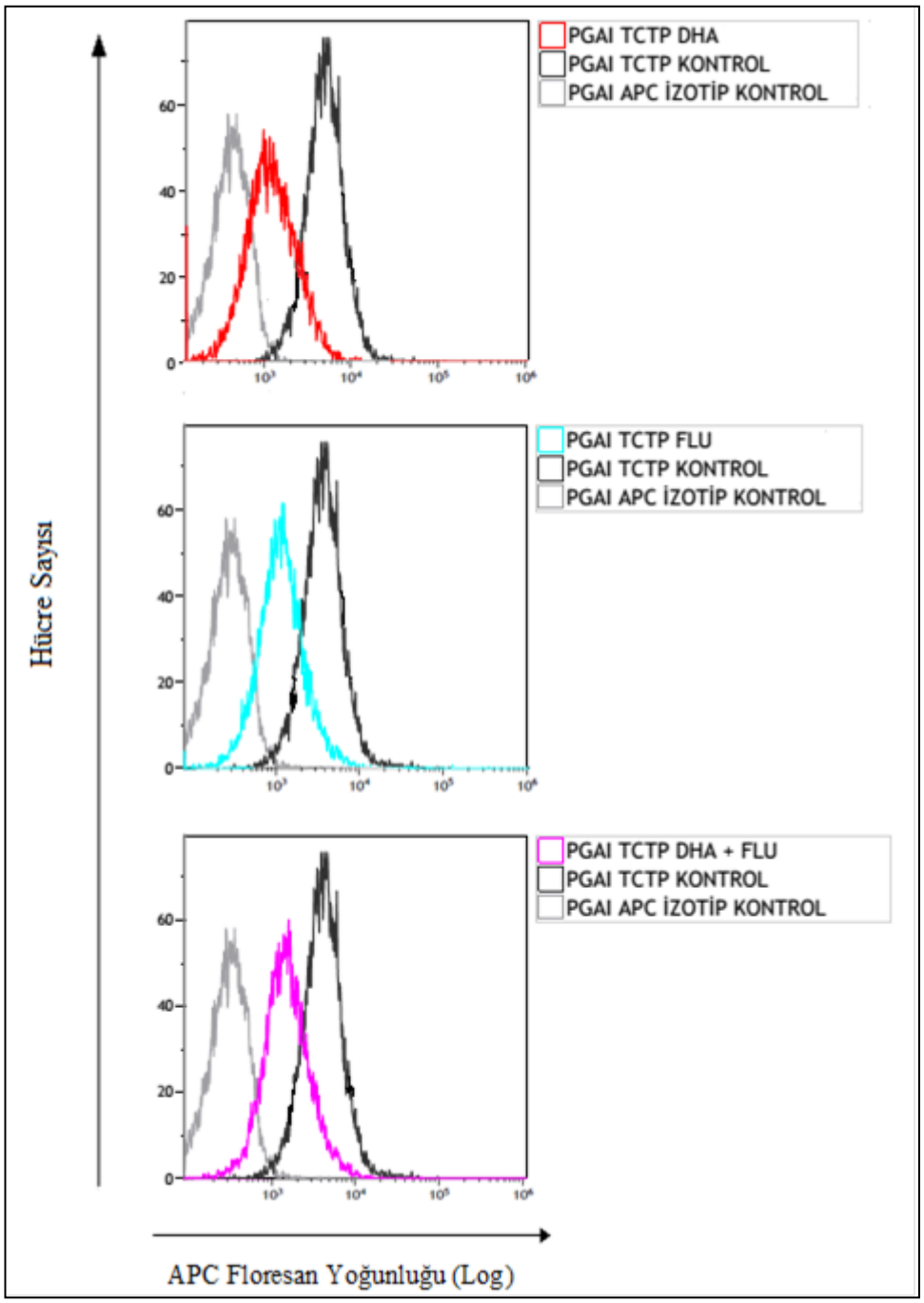
Bu amaçla hücreler, 6 kuyucuklu kültür plaklarında her bir kuyuya 10^6 hücre gelecek şekilde ekildi. Ajanların XTT hücre canlılık deneyi sonucunda belirlenen IC_{50} konsantrasyonları hücrelere uygulandı. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmadı. Deneydeki tüm gruplar üç tekrar olarak planlandı. 24 saat inkübasyondan sonra floresan işaretli TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 antikorları ile hücreler boyanarak akım sitometrik analizleri yapıldı. Analizlerden önce izotip kontrollerde ışıma olup olmadığı değerlendirildi. Işıma olmadığı saptandıktan sonra antikor boyamalarının analizleri yapıldı. Analiz için kullanılan Beckman Coulter Navios cihazı ve Kaluza yazılım programında lenfosit hücreleri etrafında oluşturulan kapılama ile hücre dağılımı, histogram grafikler olarak görüntülendi. Protein ifadeleri, histogramlar üzerinde floresan yoğunluğuna göre değerlendirildi. Ortalama floresan yoğunluğu (*Mean Fluorescence Intensity*=MFI) ve standart sapmalar belirlendi.

4.8.1. PGA-1 hücrelerinde akım sitometri ile protein ifade düzeylerinin karşılaştırılması

PGA-1 hücrelerine; belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 22,82 uM olan DHA, belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 88,73 uM olan FLU ve 20 uM DHA + 50 uM FLU birlikte uygulandıktan sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin konsantrasyona bağlı olarak karşılaştırmalı değerlendirmeleri için akım sitometrik analizler yapıldı.

Şekil 4.29'da DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda PGA-1 hücrelerinin APC floresan boya ile işaretli anti-insan TCTP antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı

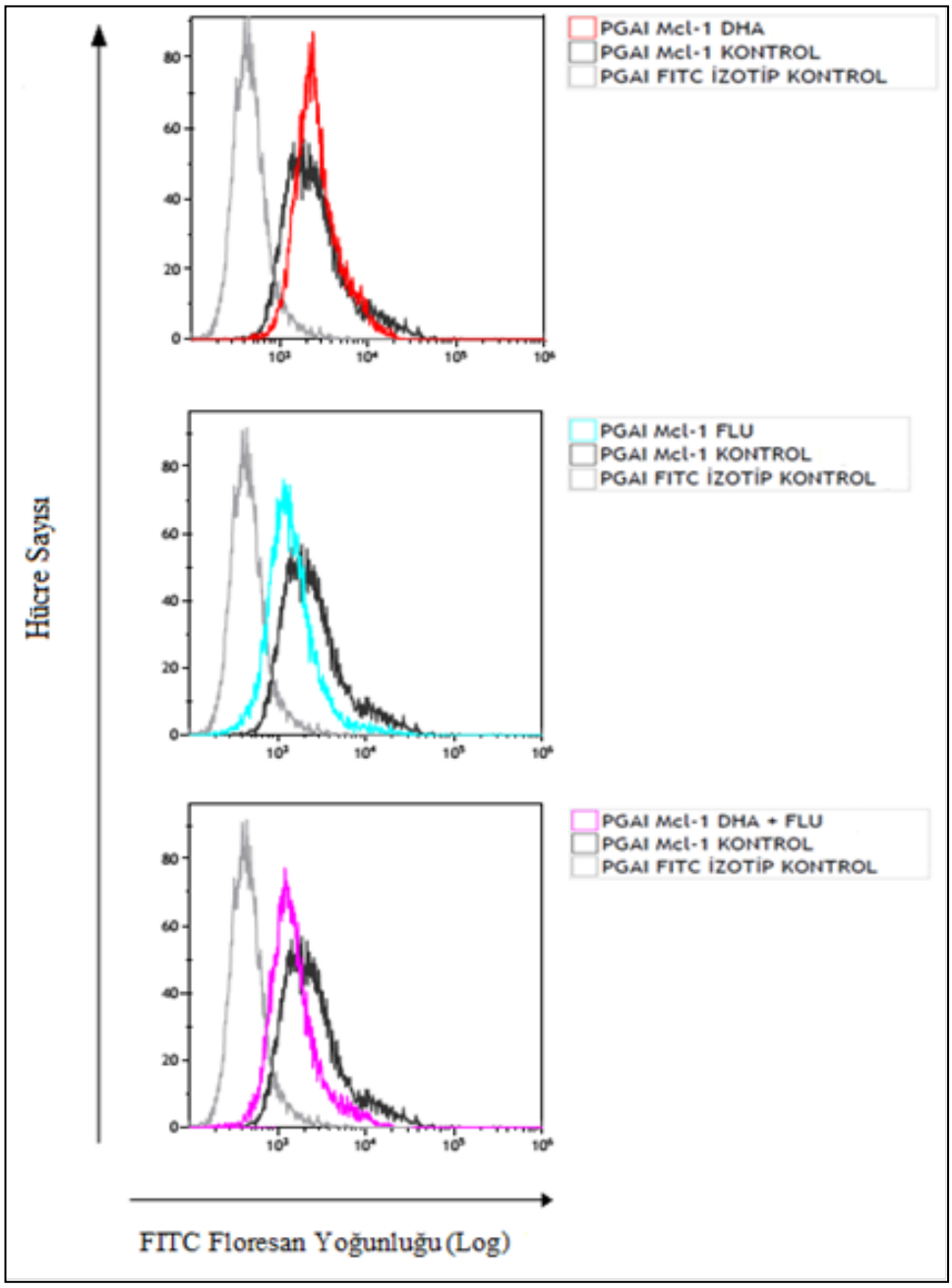
görülmektedir. Bu analizler sonucunda anti-apoptotik özellikteki TCTP protein ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA ve FLU ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma belirlendi ($p<0,05$).



Şekil 4.29. PGA-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra TCTP protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

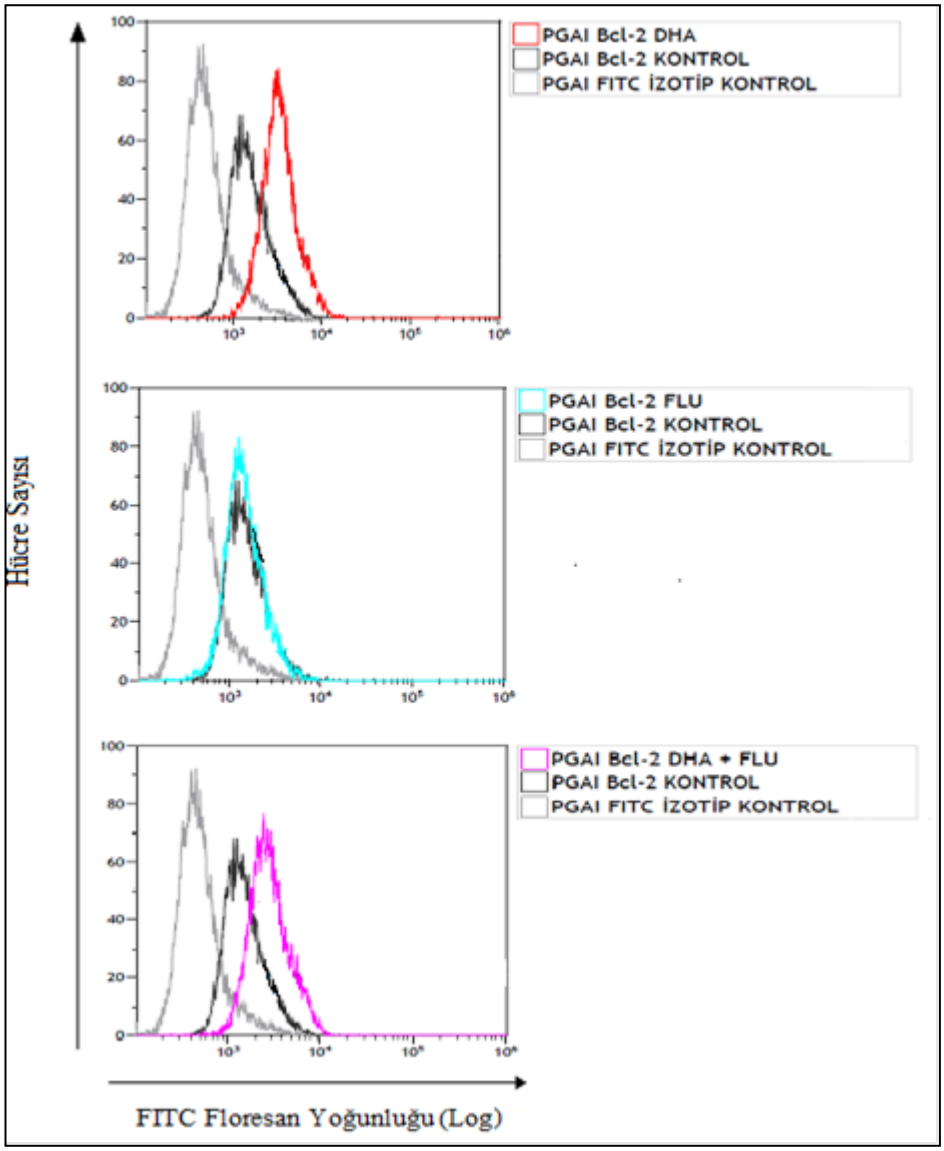
Şekil 4.30'da DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda PGA-1 hücrelerinin FITC floresan boya ile işaretli anti-insan Mcl-1

antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Anti-apoptotik özellikteki Mcl-1 protein ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma ($p<0,001$) ve 20 uM DHA + 50 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma saptandı ($p<0,05$).



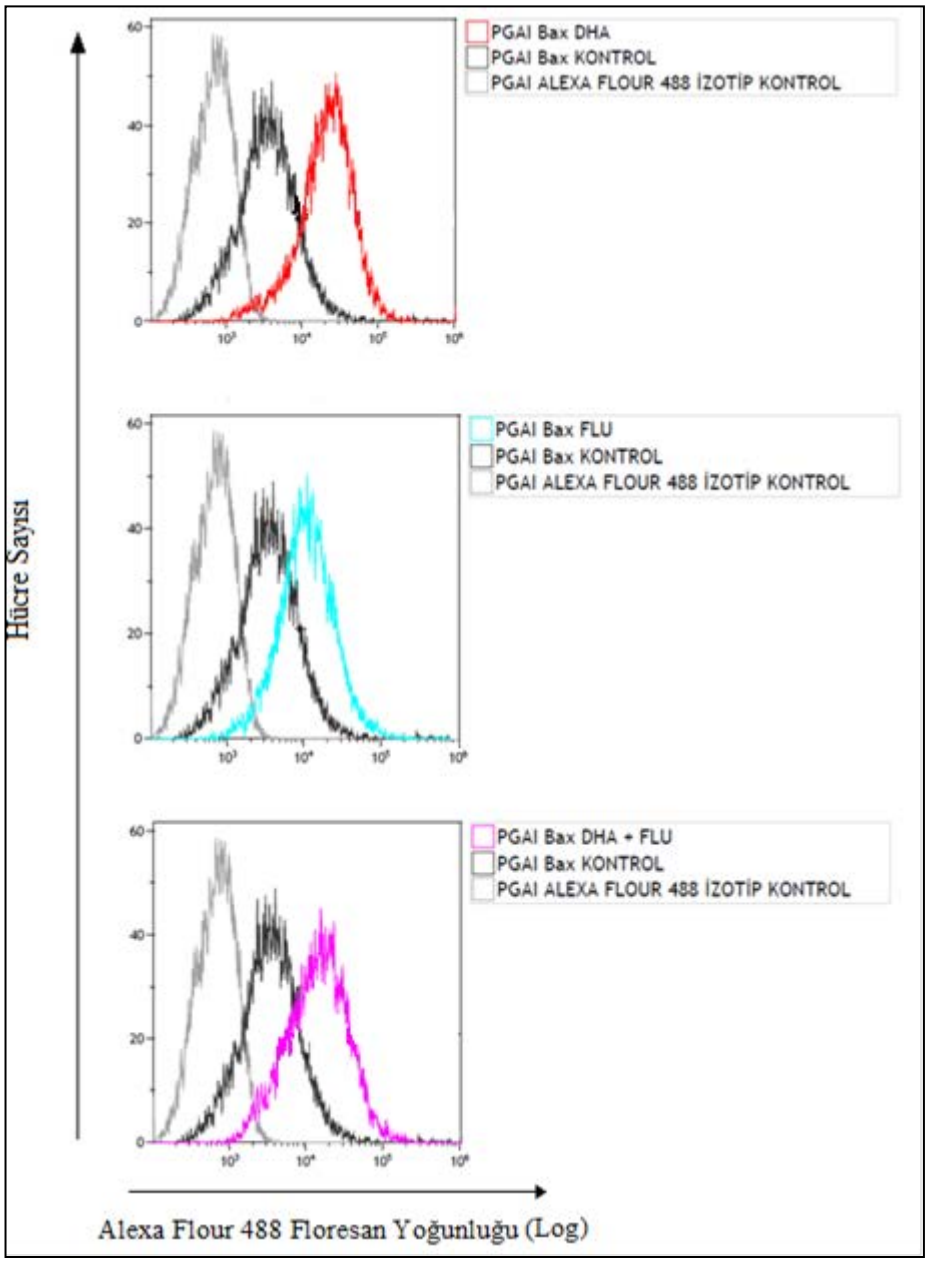
Şekil 4.30. PGA-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Mcl-1 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

Şekil 4.31'de DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda PGA-1 hücrelerinin FITC floresan boya ile işaretli anti-insan Bcl-2 antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Anti-apoptotik özellikteki Bcl-2 protein ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma ($p<0,001$), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$) ve 20 uM DHA + 50 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma gözlendi ($p<0,05$).



Şekil 4.31. PGA-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Bcl-2 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

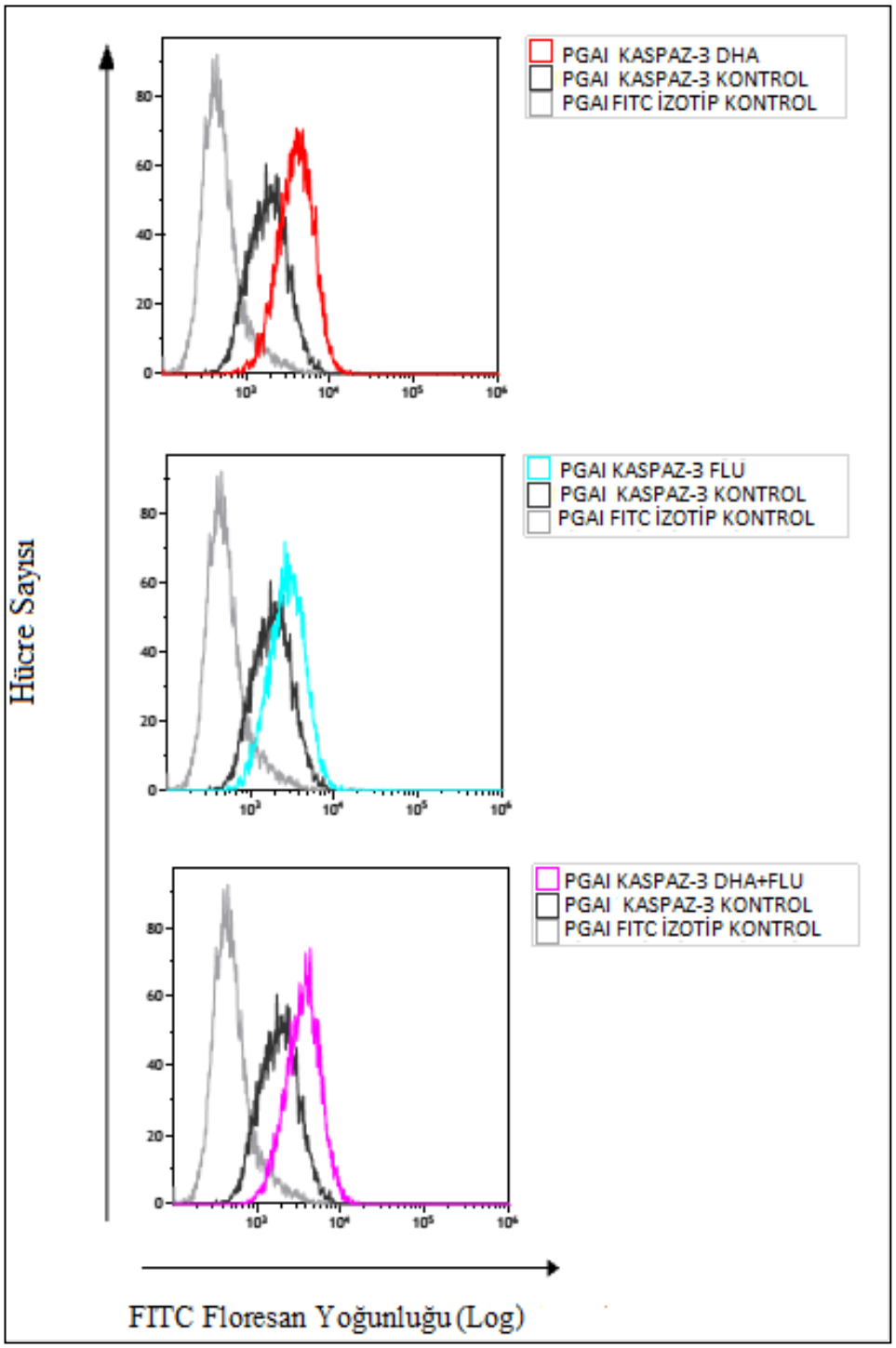
Şekil 4.32'de DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda PGA-1 hücrelerinin Alexa-Flour 488 floresan boya ile işaretli anti-insan Bax antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Apoptotik özellikte olan Bax protein ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA ($p<0,001$), FLU ($p<0,05$) ve DHA+FLU birlikte ($p<0,001$) uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma belirlendi.



Şekil 4.32. PGA-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Bax protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

Bunların dışında sonuçlar, Bax ortalama floresan yoğunluğunun (Bax MFI) Bcl-2 ortalama floresan yoğunluğuna (bcl-2 MFI) bölünmesiyle elde edilen bir indeks (Bax/Bcl-2) olarak da ifade edildi. DHA ve FLU ayrı ayrı ve 20 uM DHA + 50 uM FLU birlikte uygulanan PGA-1 hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranı, özellikle DHA uygulanmış gruplarda kontrole göre artmış bulundu. Buna göre kontrol hücrelerinde 1,93 olan Bax/Bcl-2 oranı, DHA uygulanan hücrelerde 6,16, FLU uygulanan hücrelerde 3,74 ve DHA+FLU birlikte uygulanan hücrelerde 4,34 olarak belirlendi.

Şekil 4.33'de DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda PGA-1 hücrelerinin FITC floresan boya ile işaretli anti-insan aktif Kaspaz-3 antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Aktif Kaspaz-3 protein ifade düzeylerinde ise kontrole göre, DHA tek başına ve 20 uM DHA + 50 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma ($p<0,05$), FLU uygulanmasından sonra ise 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$) saptandı.



Şekil 4.33. PGA-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

Şekil 4.34'de ise PGA-1 hücrelerinde DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerini analiz etmek amacıyla akım sitometride belirlenen MFI değerleri karşılaştırıldı. Yatay eksenlerde proteinler, dikey eksende MFI değerleri görülmektedir. Değerler ortalama ve standart sapma olarak verildi.

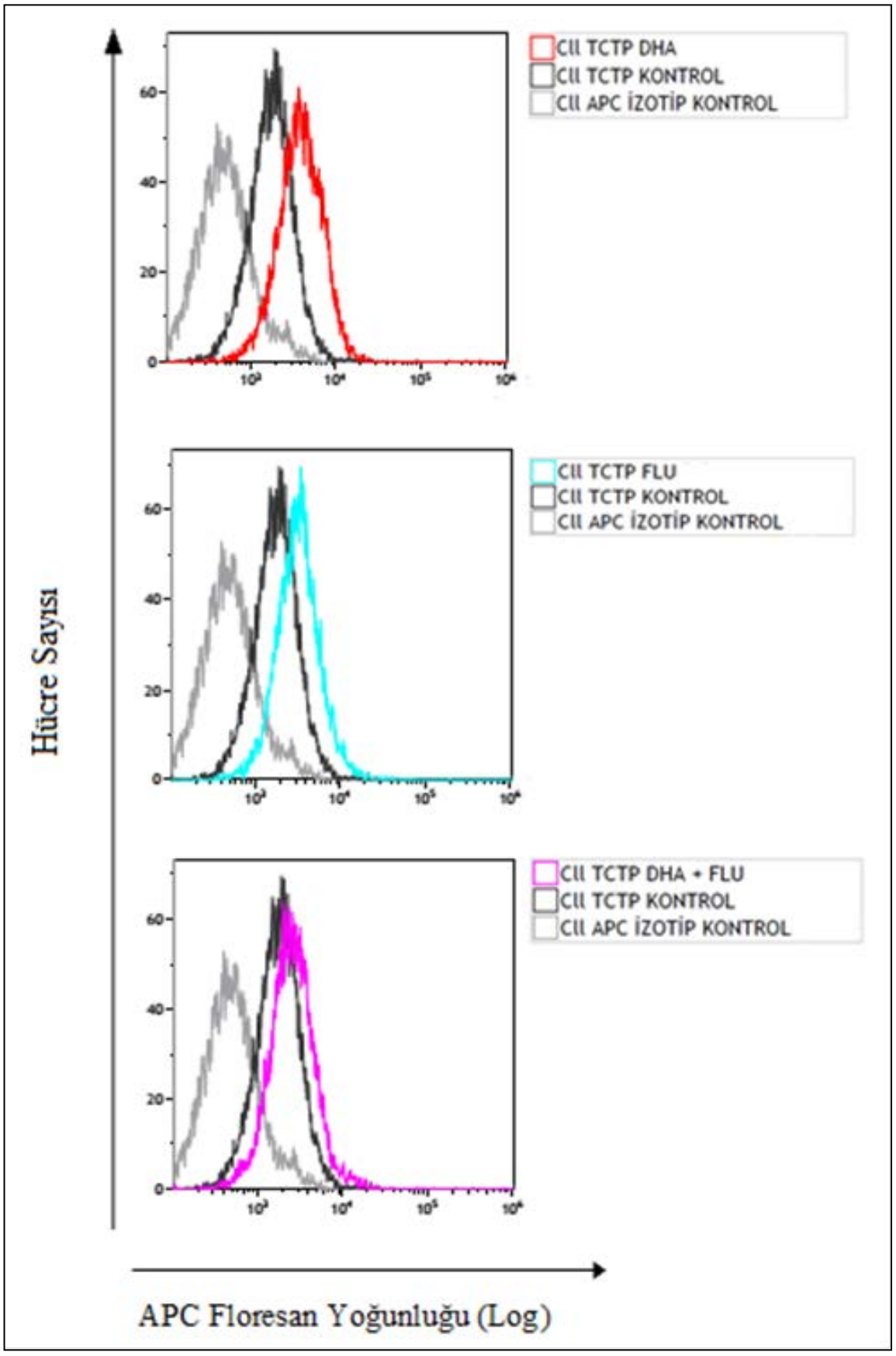


Şekil 4.34. PGA-1 hücrelerinde DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin analizi için akım sitometride belirlenen MFI değerlerinin karşılaştırılması (*; $p<0.05$) (**;$p<0.001$)

4.8.2. CII hücrelerinde akım sitometri ile protein ifade düzeylerinin karşılaştırılması

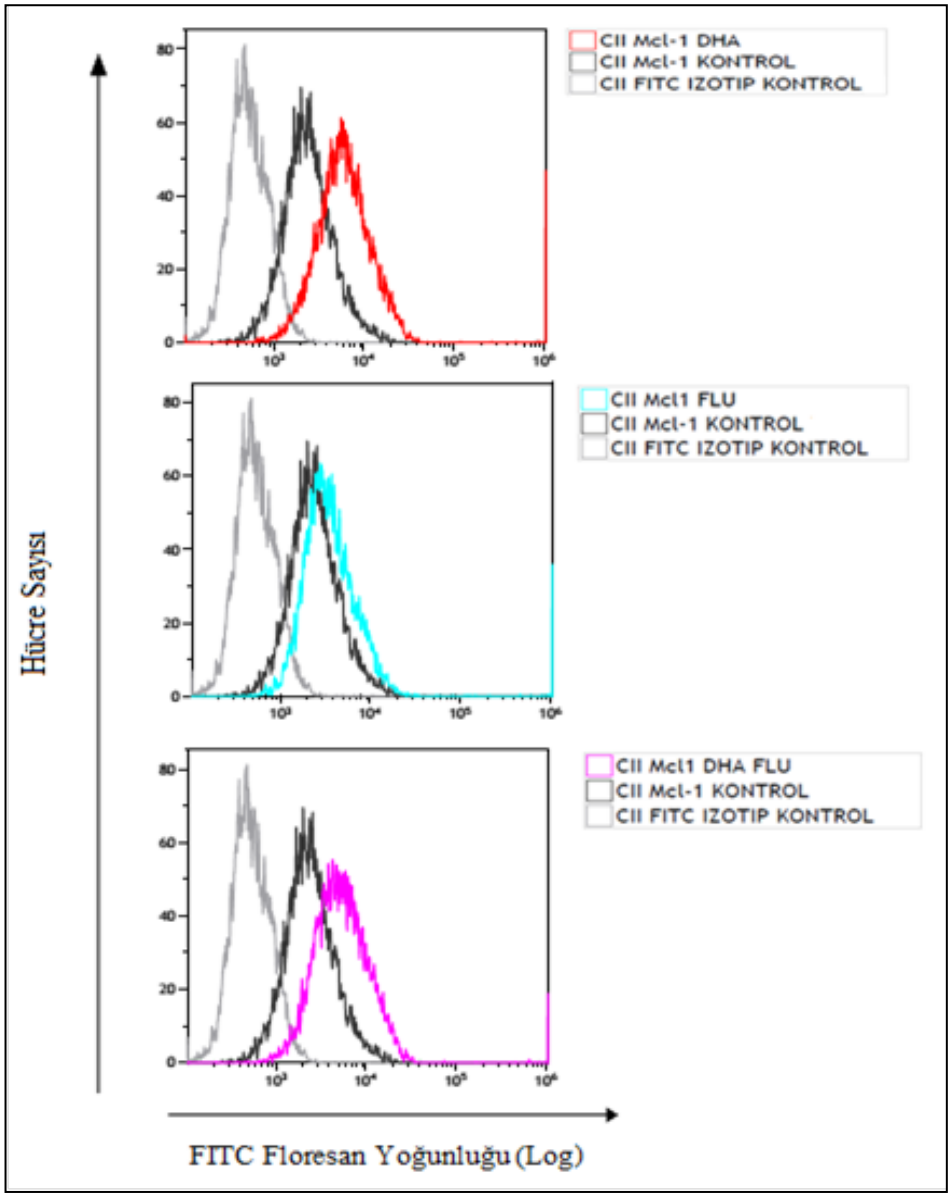
CII hücrelerine; belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 30,25 uM olan DHA, belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 83,80 uM olan FLU ve ve 10 uM DHA + 40 uM FLU birlikte uygulandıktan sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin konsantrasyona bağlı olarak karşılaştırmalı değerlendirmeleri için akım sitometrik analizler yapıldı.

Şekil 4.35'de DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda CII hücrelerinin APC floresan boya ile işaretli anti-insan TCTP antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Bu analizler sonucunda anti-apoptotik özellikteki TCTP protein ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA uygulamasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma ($p<0,001$) ve yine FLU tek başına ve 10 uM DHA + 40 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda da istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma ($p<0,05$) belirlendi.



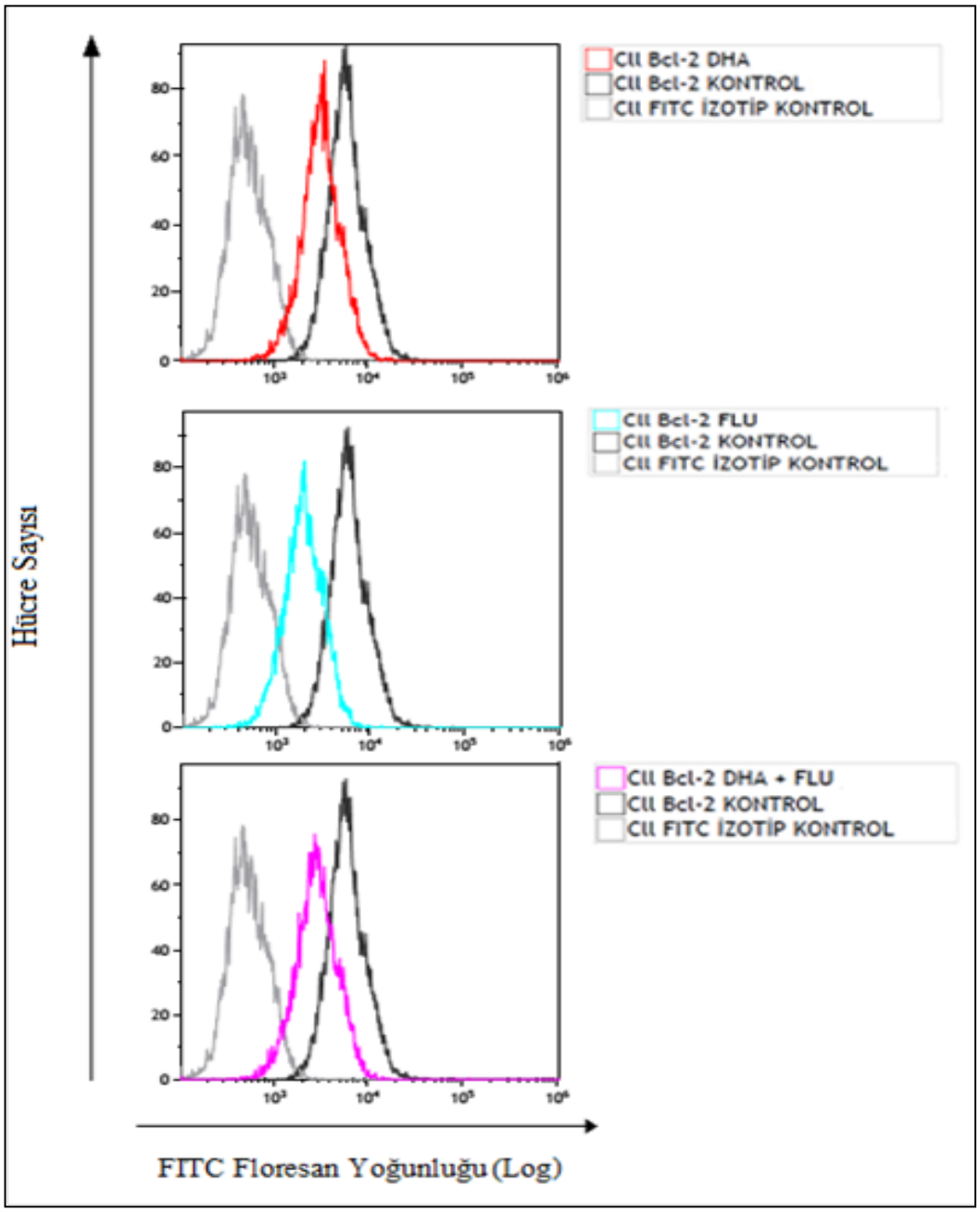
Şekil 4.35. CII hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra TCTP protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

Şekil 4.36'da DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda CII hücrelerinin FITC floresan boya ile işaretli anti-insan Mcl-1 antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Anti-apoptotik özellikteki Mcl-1 protein ifade düzeylerinde ise kontrole göre, DHA ($p<0,001$) ve 10 uM DHA + 40 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma ($p<0,001$) ve yine FLU uygulanmasından sonra da 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma ($p<0,05$) saptandı.



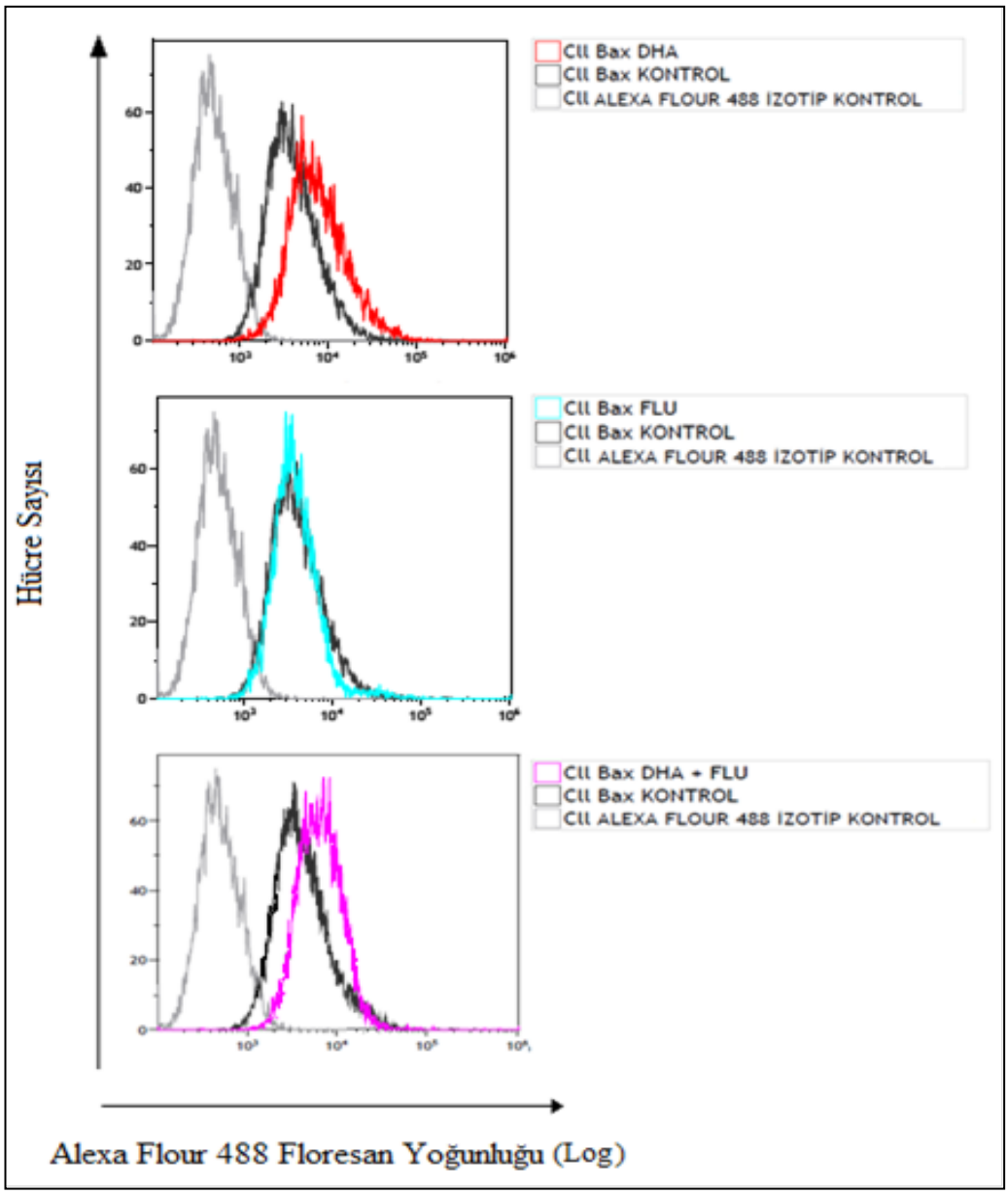
Şekil 4.36. CII hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Mcl-1 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

Şekil 4.37'de DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda CII hücrelerinin FITC floresan boya ile işaretli anti-insan Bcl-2 antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Anti-apoptotik özellikteki Bcl-2 protein ifade düzeylerinde ise kontrole göre, DHA ve FLU ayrı ayrı ve 10 uM DHA + 40 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma ($p<0,05$) belirlendi.



Şekil 4.37. CII hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Bcl-2 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

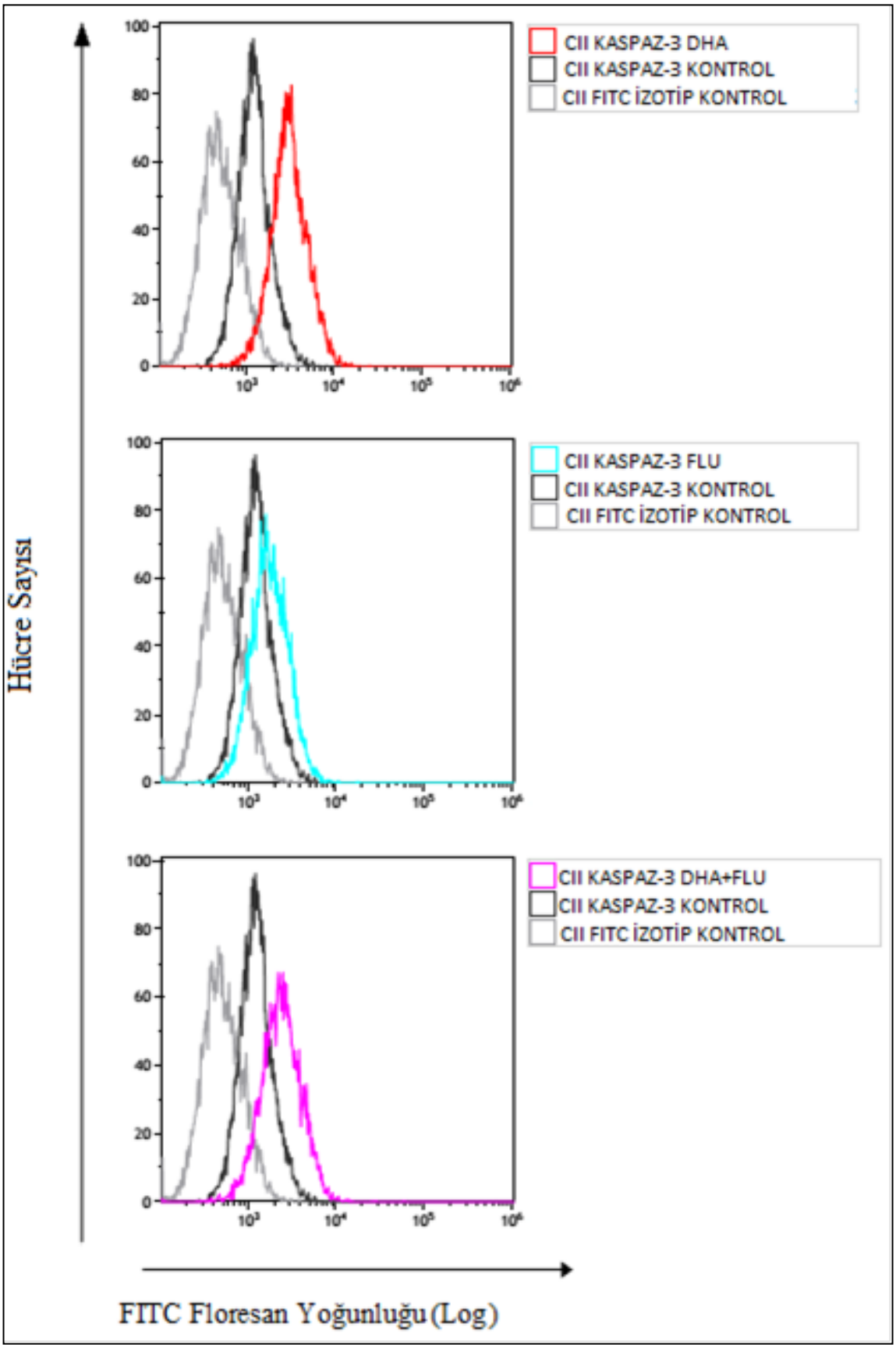
Şekil 4.38'de DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda CII hücrelerinin Alexa-Flour 488 floresan boya ile işaretli anti-insan Bax antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Apoptotik özellikte olan Bax protein ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA ve DHA+FLU birlikte ($p<0,001$) uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde artma ($p<0,001$), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda anlamlı ölçüde azalma ($p<0,05$) belirlendi.



Şekil 4.38. CII hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Bax protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

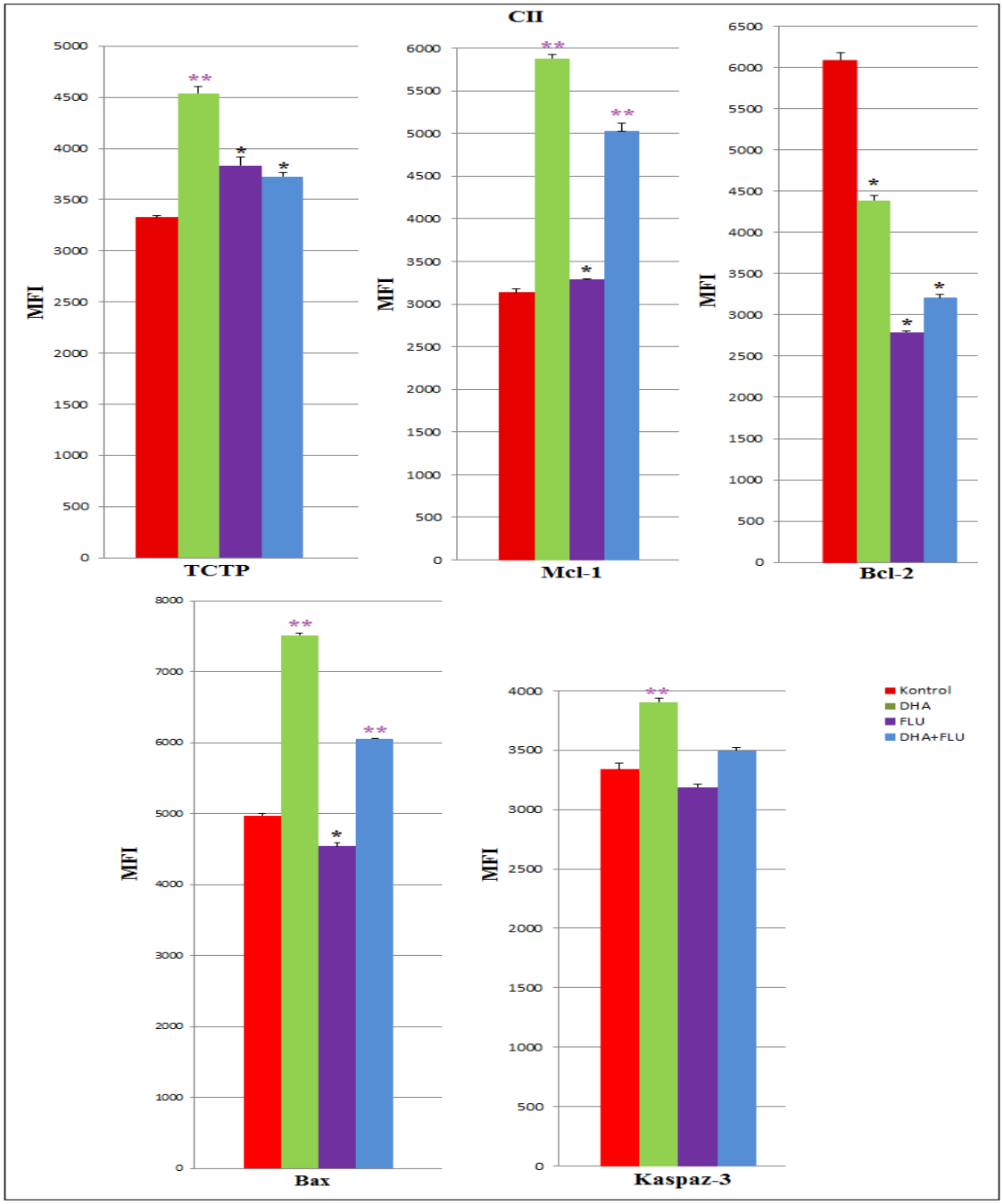
Bunların dışında sonuçlar, Bax ortalama floresan yoğunluğunun (Bax MFI) Bcl-2 ortalama floresan yoğunluğuna (bcl-2 MFI) bölünmesiyle elde edilen bir indeks (Bax/Bcl-2) olarak da ifade edildi. DHA ve FLU ayrı ayrı ve 10 uM DHA + 40 uM FLU birlikte uygulanan CII hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranı özellikle DHA uygulanmış gruplarda kontrole göre artmış bulundu. Buna göre kontrol hücrelerinde 0,81 olan Bax/Bcl-2 oranı, DHA uygulanan hücrelerde 2,2, FLU uygulanan hücrelerde 1,6 ve DHA+FLU birlikte uygulanan hücrelerde 1,94 olarak belirlendi.

Şekil 4.39'de DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda CII hücrelerinin FITC floresan boya ile işaretli anti-insan aktif Kaspaz-3 antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Aktif Kaspaz-3 protein ifade düzeylerinde ise kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma ($p<0,05$), FLU tek başına ve 10 uM DHA + 40 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$) saptandı.



Şekil 4.39. CII hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

Şekil 4.40'da ise CII hücrelerinde DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerini analiz etmek amacıyla akım sitometride belirlenen MFI değerleri karşılaştırıldı. Yatay eksenlerde proteinler, dikey eksende MFI değerleri görülmektedir. Değerler ortalama ve standart sapma olarak verildi.

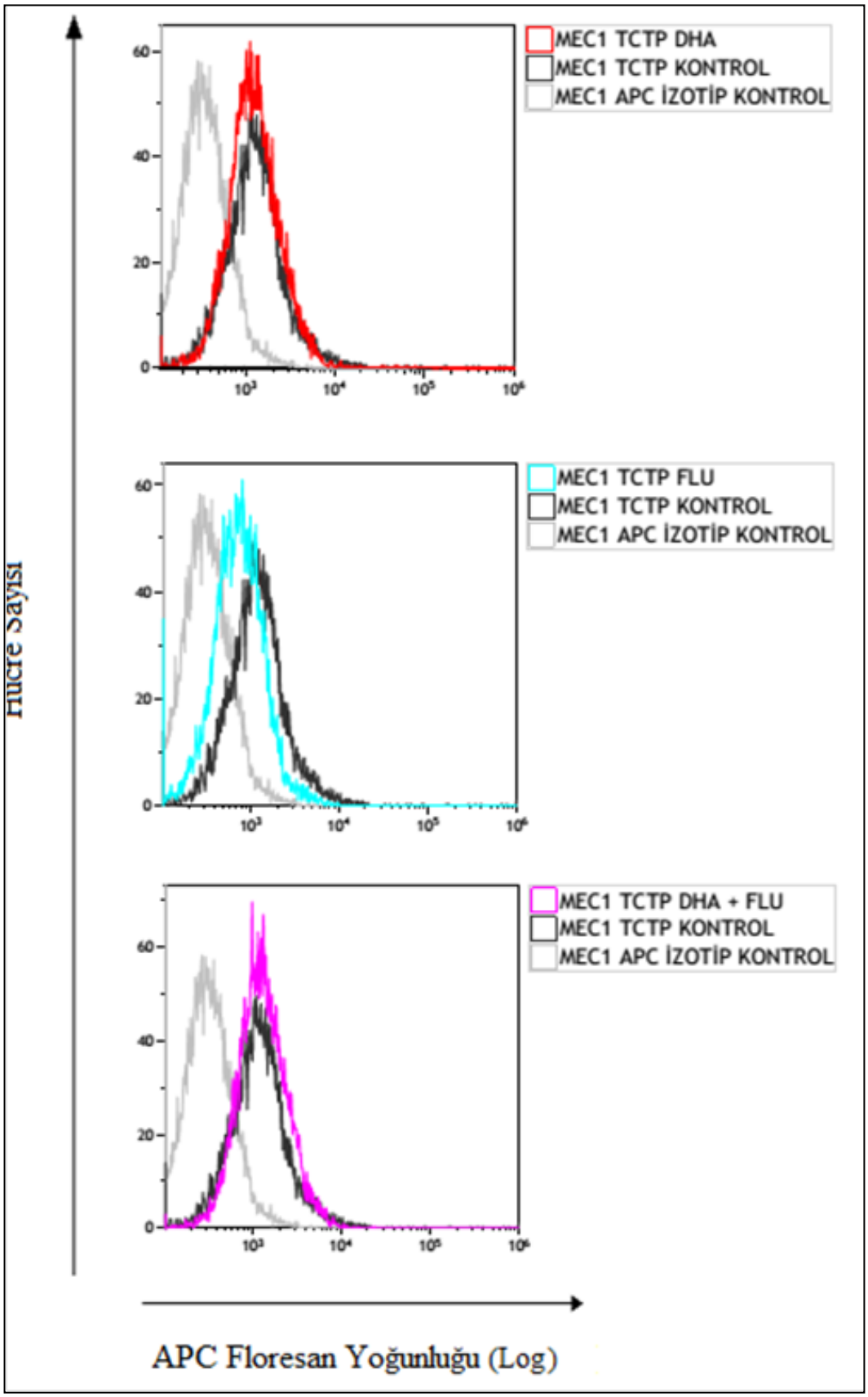


Şekil 4.40. CII hücrelerinde DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin analizi için akım sitometride belirlenen MFI değerlerinin karşılaştırılması (*; $p<0.05$) (**;$p<0.001$)

4.8.3. MEC-1 hücrelerinde akım sitometri ile protein ifade düzeylerinin karşılaştırılması

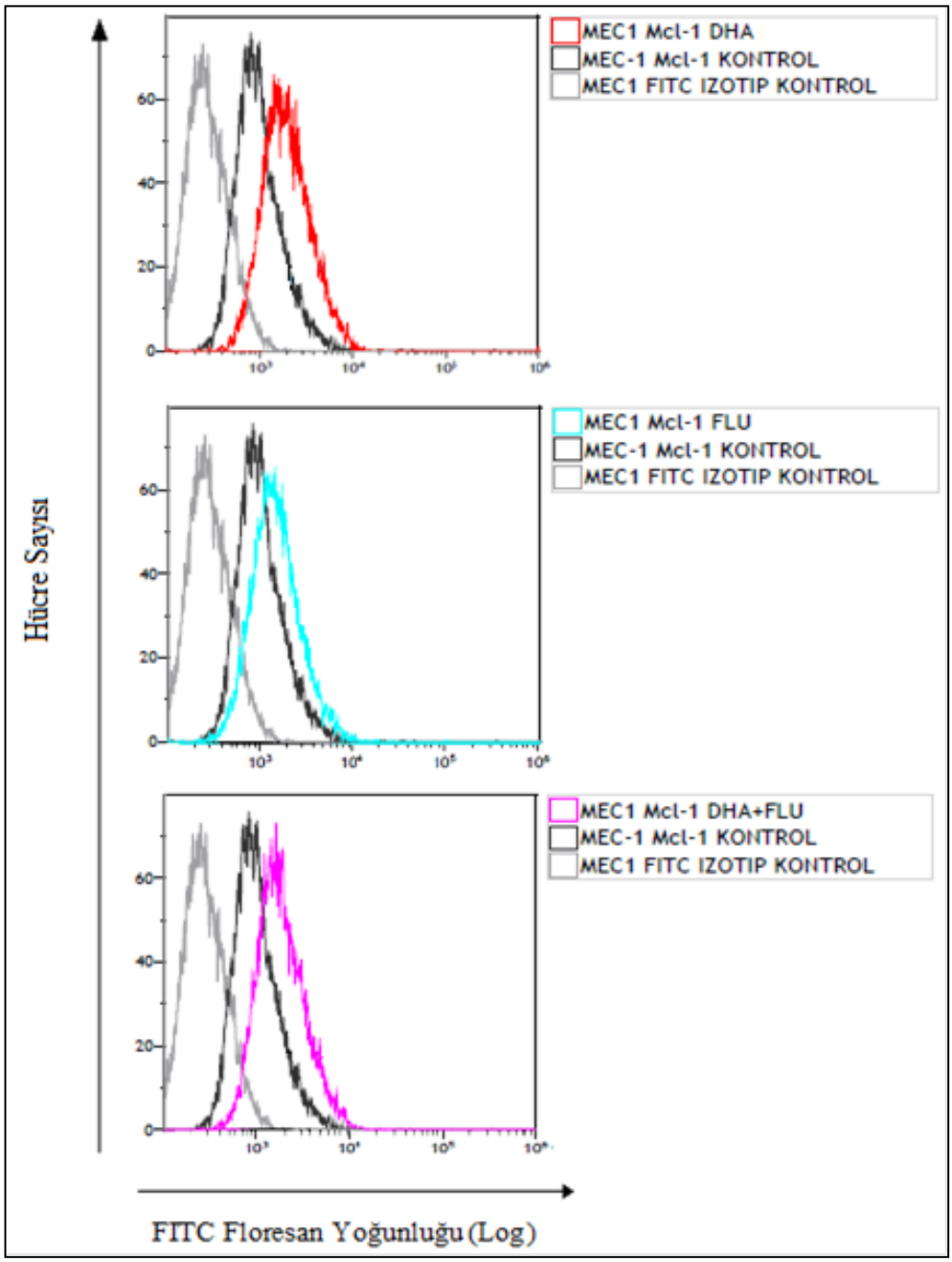
MEC-1 hücrelerine; belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 45,42 uM olan DHA, belirlenen IC_{50} konsantrasyonu 96,54 uM olan FLU ve ve 8,75 uM DHA + 20 uM FLU birlikte uygulandıktan sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin konsantrasyona bağlı olarak karşılaştırmalı değerlendirmeleri için akım sitometrik analizler yapıldı.

Şekil 4.41'de DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda MEC-1 hücrelerinin APC floresan boya ile işaretli anti-insan TCTP antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Bu analizler sonucunda anti-apoptotik özellikteki TCTP protein ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA tek başına ve 8,75 uM DHA + 20 uM FLU birlikte uygulamasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma ($p<0,05$) olduğu belirlendi.



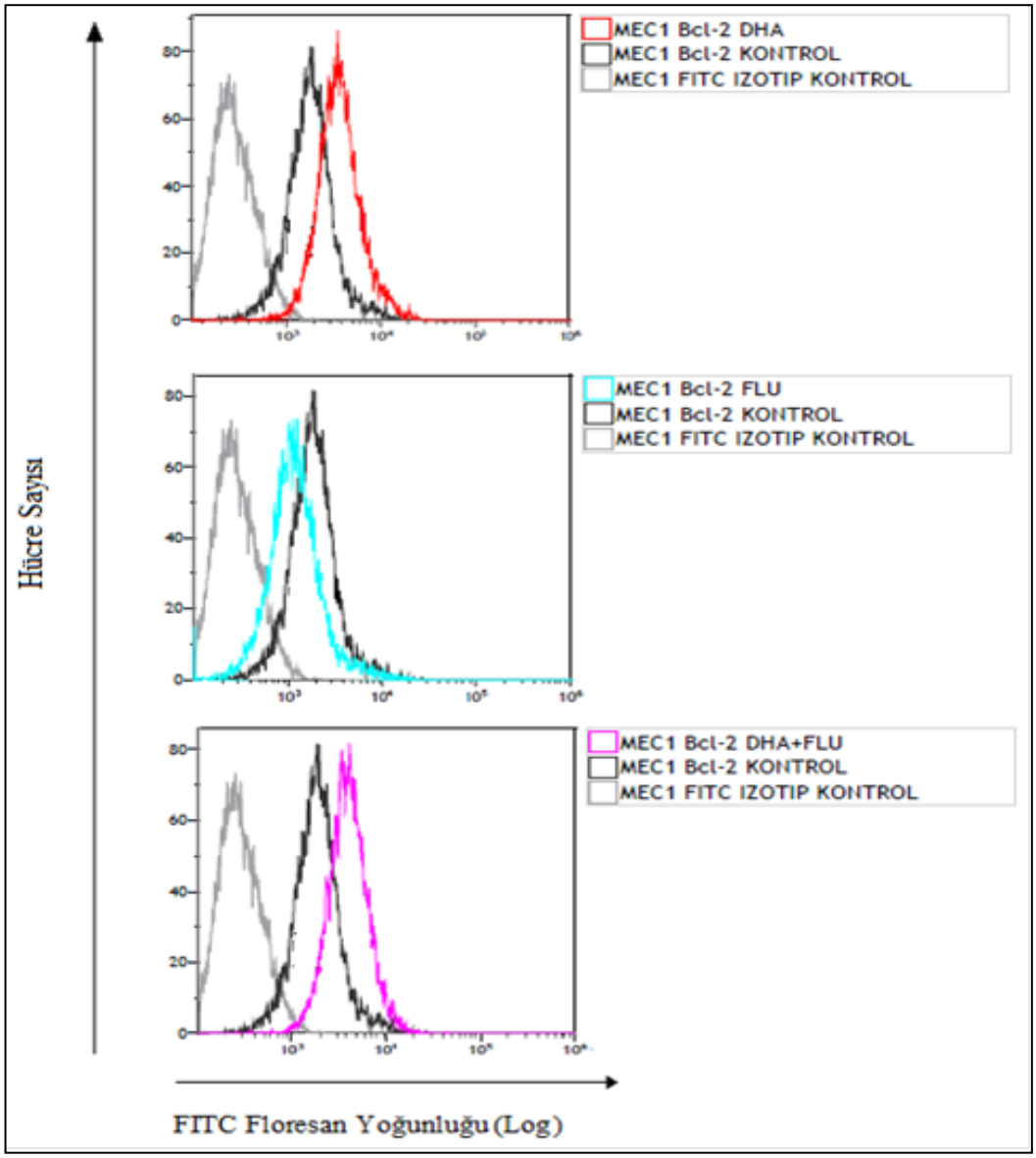
Şekil 4.41. MEC-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra TCTP protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

Şekil 4.42'de DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda MEC-1 hücrelerinin FITC floresan boya ile işaretli anti-insan Mcl-1 antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Anti-apoptotik özellikteki Mcl-1 protein ifade düzeylerinde ise kontrole göre, DHA ve FLU ayrı ayrı ve 8,75 uM DHA + 20 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma saptandı ($p<0,05$).



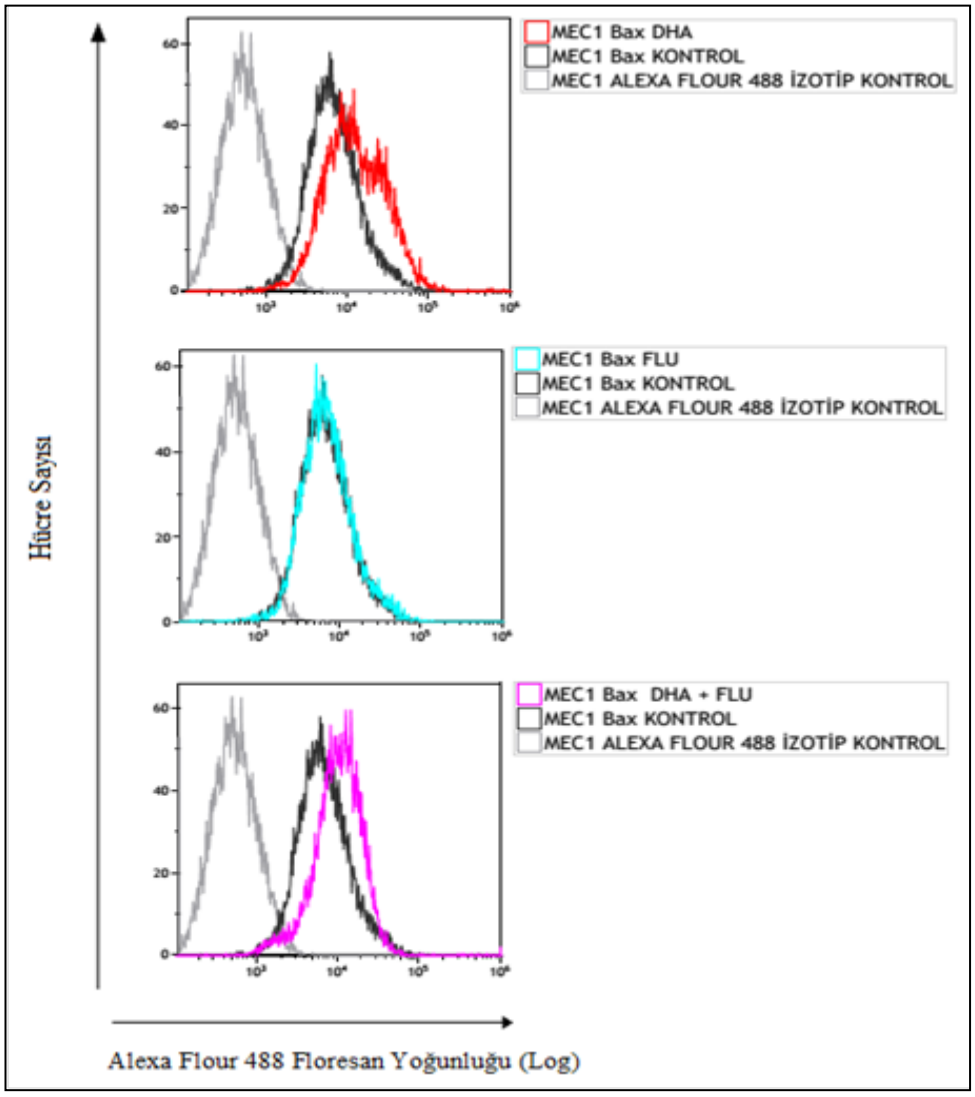
Şekil 4.42. MEC-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Mcl-1 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

Şekil 4.43'de DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda MEC-1 hücrelerinin FITC floresan boya ile işaretli anti-insan Bcl-2 antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Yine anti-apoptotik özellikteki Bcl-2 protein ifade düzeylerinde kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma ($p<0,05$), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$) ve 8,75 uM DHA + 20 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma gözlendi ($p<0,05$).



Şekil 4.43. MEC-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Bcl-2 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

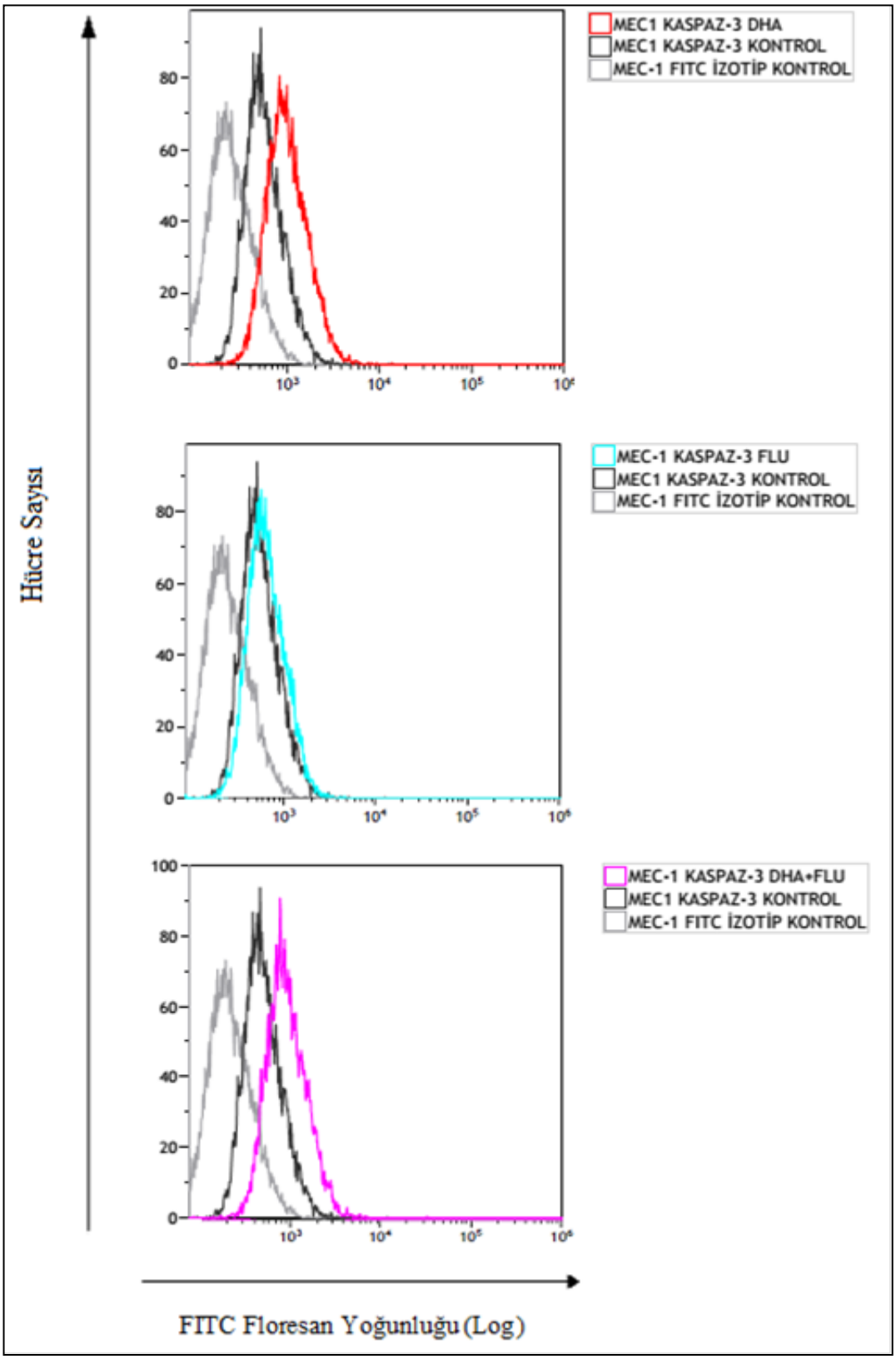
Şekil 4.44'de DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda MEC-1 hücrelerinin Alexa-Flour 488 floresan boya ile işaretli anti-insan Bax antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Apoptotik özellikte olan Bax protein ifade düzeylerinde de kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma ($p<0,001$), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$) ve 8,75 uM DHA + 20 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma olduğu belirlendi ($p<0,001$).



Şekil 4.44. MEC-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Bax protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

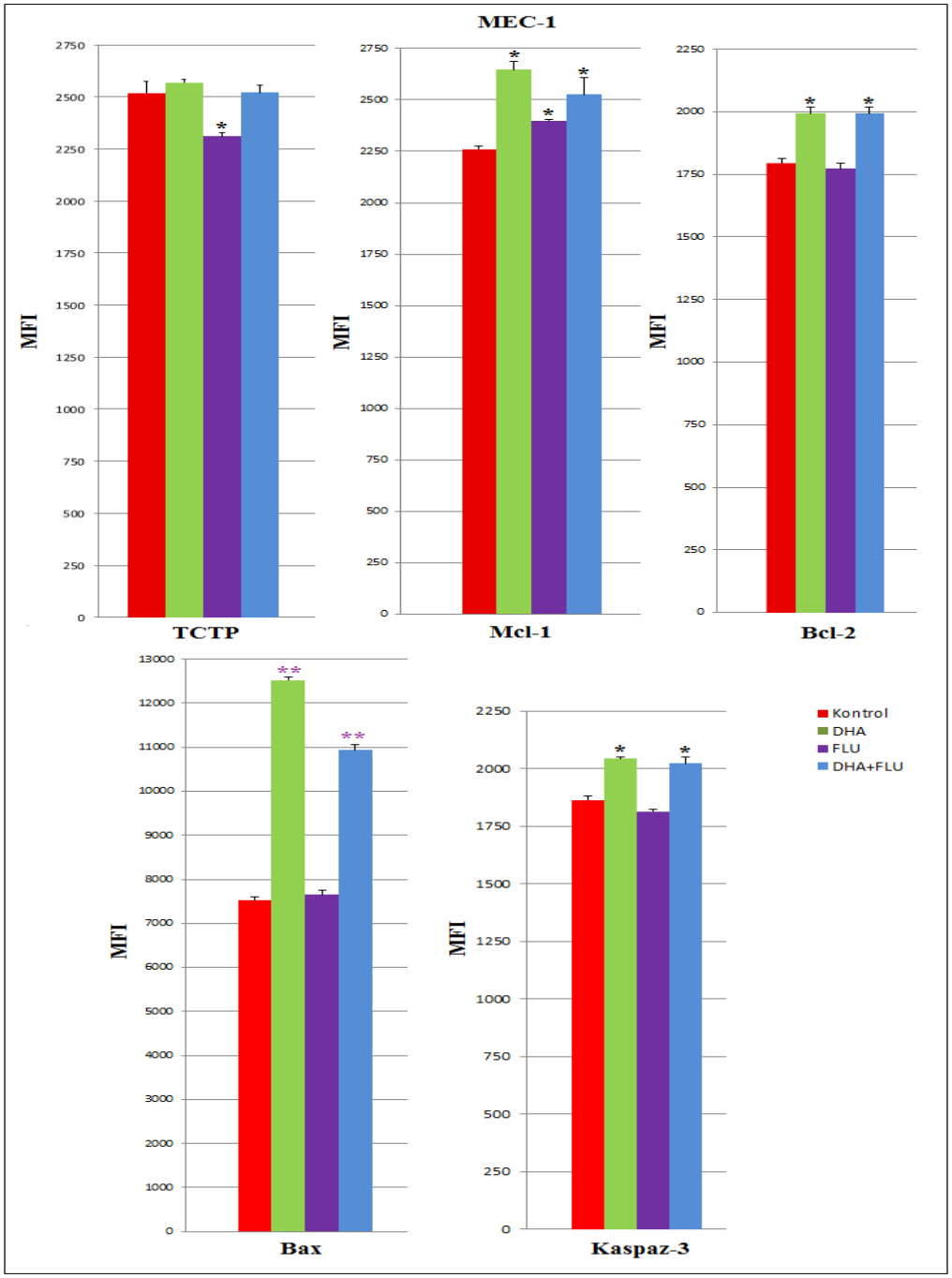
Bunların dışında sonuçlar, Bax ortalama floresan yoğunluğunun (Bax MFI) Bcl-2 ortalama floresan yoğunluğuna (bcl-2 MFI) bölünmesiyle elde edilen bir indeks (Bax/Bcl-2) olarak da ifade edildi. DHA ve FLU ayrı ayrı ve 8,75 uM DHA + 20 uM FLU birlikte uygulanan MEC-1 hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranı, özellikle DHA uygulanmış gruplarda kontrole göre artmış bulundu. Buna göre kontrol hücrelerinde 4,19 olan Bax/Bcl-2 oranı, DHA uygulanan hücrelerde 6,28, FLU uygulanan hücrelerde 4,31 ve DHA+FLU birlikte uygulanan hücrelerde 6,17 olarak belirlendi.

Şekil 4.45'de DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda MEC-1 hücrelerinin FITC floresan boya ile işaretli anti-insan aktif Kaspaz-3 antikoru ile akım sitometride yapılmış analizleri histogram grafikler olarak görülmektedir. Yatay eksenlerde logaritmik floresan yoğunluğu, dikey eksende hücre sayısı görülmektedir. Aktif Kaspaz-3 protein ifade düzeylerinde ise kontrole göre, DHA uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma ($p<0,05$), FLU uygulanmasından sonra 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p>0,05$) ve 8,75 uM DHA + 20 uM FLU birlikte uygulanmasından sonra 24 saat sonunda ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artma olduğu saptandı ($p<0,05$).



Şekil 4.45. MEC-1 hücrelerine DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerinin akım sitometride histogram grafiklerde gösterilmesi

Şekil 4.46'da ise MEC-1 hücrelerinde DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 protein ifadelerine etkilerini analiz etmek amacıyla akım sitometride belirlenen MFI değerleri karşılaştırıldı. Yatay eksenlerde proteinler, dikey eksende MFI değerleri görülmektedir. Değerler ortalama ve standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.46. MEC-1 hücrelerinde DHA, FLU ve DHA+FLU'nun IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra 24 saat sonunda TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve Aktif Kaspaz-3 ifadelerine etkilerinin analizi için akım sitometride belirlenen MFI değerlerinin karşılaştırılması (*; $p<0.05$) (**;$p<0.001$)

5. TARTIŞMA

Son on yılda kronik lenfositik lösemi (KLL) tedavisi hiç olmadığı kadar etkili ve ilgi çekici hale gelmiştir. KLL'yi tanımlayan klinik heterojenlik, hastalığın biyolojik çeşitliliğini de yansıtmaktadır. KLL tedavisindeki önemli ilerlemeler; ibrutinib, idelalisib, duvelisib ve venetoclaks gibi yeni tedavilerin geliştirilmesi, güvenilir bir şekilde yüksek riskli hastaları tanımlayan yeni testlerin bulunması ve tedavinin buna göre planlanması ile sağlanmıştır. Tüm bu gelişmelere rağmen KLL, kimi hastalar için halen çözümsüzdür. Bu yüzden yeni terapötik stratejiler önem kazanmaktadır [207]. KLL'de ilgi çekici tedavi stratejilerinden biri, apoptozu kontrol eden proteinleri hedef almaktadır. Bu proteinlerin en önemlileri apoptozu indükleyen Bax, Bak, Bad, Bid, Bim ve Puma; apoptozisi engelleyen TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL [208]. KLL'de proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengesizliğin konvansiyonel tedaviyi sınırlandırdığı düşünülmektedir [209].

İnsan kanserlerinde yeni ilaçların tasarlanması için doğal ürünler ve türevlerine 'potansiyel tedaviler' gözüyle bakılmaktadır. Bu zamana kadar bitkisel birçok ajan keşfedilmiş olmasına karşın kansere karşı etkili bileşenlerin alanını genişletmek için yeni ajanların araştırılması hala gerekli görülmektedir [171]. Çinli bilim adamları 1960 ve 1970'lerden bu yana geleneksel Çin bitkilerinden ekstrakte edilen yeni anti-malaryal bileşenleri araştırırken 1971 yılında qinghao (Artemisia annua L.) bitkisinden artemisinin'i izole etmiştir. Falciparum malaryaya karşı hızlı, güçlü etkisi ve düşük toksisitesinin yanı sıra bazı türevlerinin anti-parazitik ve anti-kanser aktiviteleri olduğunun ortaya çıkması ile araştırmalara konu olmaya devam etmiştir [210]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, DHA'nın farklı tümör hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir [211-215]. Bununla birlikte, DHA'nın KLL hücrelerine karşı etkisini irdeleyen bir çalışma yapılmamıştır. Bu doğrultuda çalışmamızda, artemisinin türevi olan dihidroartemisinin (DHA) ve anti-neoplastik bir ajan olan fludarabinin (FLU) PGA-1, CII ve MEC-1 insan KLL hücrelerine etkileri, hücre canlılığı, apoptoz, gen ve protein ifadelenme düzeylerinde çalışılmıştır.

Çalışmamızda DHA ve FLU'nun ayrı ayrı ve birlikte PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak canlılık oranlarını azaltmıştır. Tek başına DHA'nın artan konsantrasyonlarda (2,5-5-8,75-10-20-35-40-70-75 ve 80 uM) uygulanması sonucunda üç hücre serisinde de hücrelerin yarısını öldürmek için gerekli olan (IC_{50}) dozun zamana bağlı

olarak azaldığı saptanmıştır. THP-1 insan akut monositik lösemi hücrelerine 24, 48, 72 ve 96 saat artan konsantrasyonlarda DHA (0-25-50-100-150 ve 200 uM) uygulanmasının, bizim çalışmamıza benzer şekilde THP-1 hücrelerinin canlılık oranlarını doza ve zamana bağlı olarak azalttığı ve DHA'nın, THP-1 hücrelerinde apoptozu arttırdığı belirlenmiştir [216]. Molt-4 lösemi hücrelerine DHA'nın giderek artan konsantrasyonlarının tekrarlanan uygulanmasıyla DHA'ya dirençli bir Molt-4 hücre serisini (RTN) geliştiren araştırmacılar, bu hücrelere, 24 ve 48 saat süresince artan konsantrasyonda DHA (12,5-25-50-75 ve 100 uM) uygulanmasının hem Molt-4 hem de DHA dirençli RTN hücrelerinin çoğalmasını doza bağlı olarak inhibe ettiğini belirlemişler ve RTN hücrelerinin IC_{50} değeri Molt-4 hücrelerine göre anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur [217]. Jurkat T lenfoma hücrelerine, 24, 48 ve 72 saat tek başına artan konsantrasyonlarda (2,5-5-10-20-40 ve 80 uM) DHA'nin veya 48 saat 20 nM holotransferrin (HTF) birlikte uygulanmasının apoptozu indükleyip hücre siklusunu durdurduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızla uyumlu olarak DHA tek başına veya HTF ile birlikte hücre canlılığında doza ve zamana bağlı azalmaya yol açmıştır. DHA'nin IC_{50} değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırası ile 90,66 uM, 21,73 uM ve 14,56 uM bulunmuştur. DHA'nın tek başına uygulanmasına göre HTF ile birlikte uygulanması, sitotoksisiteyi daha fazla artmıştır [218]. DHA'nın kolorektal kanser hücrerinde 5-Florourasilin (5-FU) tümöre karşı aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde DHA, artemisinin (ARS) (0,625 uM-80 uM) ve 5-FU (0-160 uM) 24 ve 48 saat süresince hem tek başlarına hem de birlikte artan konsantrasyonlarda uygulanmıştır. DHA'nın ARS'ye göre daha düşük konsantrasyonlarda daha güçlü anti-kanser etkisi olduğu görülmüştür. Tek başına 5-FU veya DHA uygulanması doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılık oranlarını azaltırken, kombinasyonlarının kanser hücrelerinde daha güçlü sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur [219]. Bu ve benzeri çalışmalarda farklı ajan ve klasik kemoterapi ilaçlarıyla birlikte kullanılan DHA, bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak kanser hücre dizilerinde sitotoksik etki göstermiş ve yeni bir anti-kanser ajan olarak değerlendirilmiştir [216-224].

Kemoterapötik ilaçların kimileri tümör gelişimi ve ilerlemesinde biyolojik öneme sahiptir ve apoptozu indükleyerek anti-tümör etki göstermektedir [225]. Çalışmamızda DHA ile FLU ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasından sonra PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinde canlılık oranlarının azalmasının apoptozdan mı yoksa nekrozdan mı kaynaklı olduğunu belirlemek için Annexin V-FITC ve PI ile boyanan hücrelere akım sitometrik analiz yapılmıştır. Buna göre tek başına DHA, PGA-1 hücrelerinde erken apoptoz ($p<0,001$) ve

geç apoptoz + nekrozu ($p<0,05$) kontrole göre anlamlı ölçüde artırmıştır. Yalnız nekroz oranında ise istatistiksel farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). PGA-1 hücrelerinde tek başına FLU, erken apoptoz, geç apoptoz + nekroz ve nekroz oranını kontrole göre anlamlı ölçüde artırmıştır ($p<0,05$). DHA ile FLU'nun birlikte uygulanması erken apoptoz ve geç apoptoz + nekrozu kontrole göre anlamlı ölçüde artırırken ($p<0,05$), yalnız nekrozda istatistiksel anlamlı fark yaratmamıştır ($p>0,05$). Özetle PGA-1 hücrelerinde DHA tek başına veya FLU ile birlikte apoptozu artırmış, tek başına FLU ile hücreler apoptozun yanında nekroza da gitmiştir. PGA-1 hücrelerine yalnız DHA uygulanması tek başına FLU veya DHA ile birlikte FLU uygulamasına göre daha etkili bulunmuştur.

Tek başına DHA, CII hücrelerinde erken apoptoz ($p<0,05$), geç apoptoz + nekroz ($p<0,001$) ve nekrozu ($p<0,05$) kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırmıştır. Tek başına FLU ile DHA ve FLU kombinasyonu erken apoptoz oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark yaratmamış ($p>0,05$), tek başına FLU geç apoptoz + nekroz ($p<0,05$) ve yalnız nekroz ($p<0,001$) oranında kontrole göre anlamlı artışa neden olmuş; DHA ile FLU kombinasyonu da geç apoptoz + nekroz ve yalnız nekrozu anlamlı ölçüde artırmıştır ($p<0,001$). CII hücrelerinde tek başına DHA uygulanması, tek başına FLU veya DHA ile FLU kombinasyonuna göre daha etkili bulunmuş, FLU CII hücrelerini apoptoz yanında daha fazla nekroza götürmüştür.

DHA, MEC-1 hücrelerinde kontrole göre erken apoptoz ($p<0,05$), geç apoptoz + nekroz ve nekroz ($p<0,001$) oranını artırmıştır. Tek başına FLU ile DHA ve FLU kombinasyonu erken apoptozda anlamlı istatistiksel fark yaratmamıştır ($p>0,05$). Bunun yanı sıra tek başına FLU, geç apoptoz + nekroz ($p<0,05$) ve yalnız nekroz ($p<0,001$) oranını kontrole göre anlamlı ölçüde artırırken, DHA ve FLU kombinasyonu geç apoptoz + nekroz ve yalnız nekrozda istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmuştur ($p<0,001$). DHA'nın tek başına uygulanması, tek başına FLU veya DHA ve FLU kombinasyonuna göre MEC-1 hücrelerinde daha etkili bulunmuş, FLU veya FLU ile DHA kombinasyonu ile MEC-1 hücrelerinin nekroza gittiği gözlenmiştir.

DHA tüm hücrelerde erken ve geç apoptozu arttırırken; FLU, MEC-1 dışındaki 2 hücre dizisinde apoptozu arttırmıştır. DHA, MEC-1 hücrelerine tek başına etkin bulunmuştur. MEC-1 hücreleri 17p delesyonu taşımaktadır. 17p delesyonlu hastalarda yapılan çalışmalar ilaç direncinin kötü prognoz ile ilişkisini göstermiştir [226-228]. Yine p53 gen kaybı olan

17p delesyonlu kronik lenfositik lösemili hücreleri fludarabin ile apoptoza in vitro dirençli bulunmuştur [229]. Dolayısı ile çalışmamızda FLU'nun MEC-1 hücrelerinde etkisiz olduğu gözlemimiz, 17p delesyonu ile ilişkilendirilebilir. Daha da önemli olan DHA'nın 17p delesyonlu hücrelerde apoptozu uyarmasıdır. Bu bulgunun 17p/p53 delesyonu taşıyan KLL hücre dizilerinde ve primer hasta hücrelerinde doğrulanmasına ihtiyaç vardır. IgVH mutasyon durumunun hastalığın seyri ve progresyon açısından riski belirlemede yararlı olduğu ve mutasyonsuz IgVH genlerinin daha agresif bir hastalık seyri gösterdiği bildirilmektedir [97, 106, 230, 231]. MEC-1 ve PGA-1 hücrelerinde IgVH mutasyonludur, CII hücrelerinde ise IgVH mutasyonsuzdur. DHA ve FLU uygulamalarından sonra PGA-1 hücrelerine göre IgVH mutasyonu olmayan CII hücrelerinde geç apoptoz ve nekroza daha çok eğilim görülmesinin mutasyon durumuyla bağlantısı olup olmadığının ileri çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.

Farklı kanser hücrelerinde yapılan çalışmalar bizim çalışmamızla uyumlu olarak DHA'nın tek başına veya sinerjistik olarak apoptozu indüklediğini göstermiştir. Bunlardan HepG2 insan hepatosellüler karsinoma hücrelerine DHA'nın etkisi MTT tayini ve Anneksin 5-FITC/PI ikili boyamasıyla akım sitometrik olarak analiz edilmiştir. DHA'nın doz ve zamana bağlı HepG2 hücre proliferasyonunu anlamlı ölçüde inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir. DHA'nın reaktif oksijen türleri (ROT) ve Ca^{+2}'nin hücre içinde üretimini arttırdığı, hücrelerde büyüme duraklamasına neden olduğu, DNA hasarını indükleyici gen 153 (GADD153) ve Bax ifadelenmesini arttırıp Bcl-2'yi azalttığı gözlenmiştir [232]. SKOV3, over kanseri hücrelerine DHA ve Curcumin'in (Cur) ayrı ayrı ve birlikte 24 ile 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanmasının hücre canlılığı ve apoptoza etkileri araştırılmıştır. Apoptoz, Annexin V-FITC ile akım sitometride analiz edilmiştir. DHA ve Cur'un birlikte uygulanmasının tek başına uygulamaya göre daha etkili olduğu, sinerjistik olarak hücre canlılığını azalttığı, hücre siklusunu durduğu ve apoptoza götürdüğü belirlenmiştir [233]. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde DHA ve doksorubisin'in (DOX) anti-proliferatif etkileri MTT tayini, apoptotik etkileri Annexin V-FITC/PI ile akım sitometrik olarak araştırılmıştır. DHA DOX kombinasyonunun tek başına DHA'ya göre apoptozu daha fazla indüklediği bildirilmiştir [234].

Hücresel apoptoz, ölüm reseptörü ile ekstrinsik yolak veya mitokondri-apoptozom ile intrinsik yolak üzerinden indüklenebilir. Bcl-2 ailesi üyeleri ve kaspazlar apoptozun

bilinen temel aracılarıdır. Bcl-2, Mcl-1, Bax ve Bid hücre sağ kalımı/apoptoz açısından en kritik ve en iyi karakterize edilmiş olanlarıdır. Kaspaz-3, intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolaklar ile hücre ölümünün doğrulanmasında kaspazlar arasında en önemlisidir [235-239]. Tümör hücreleri, Bcl-2 ifadelenmesinde artış veya Bax ifadelenmesinde azalma veya mutasyon gibi kimi moleküler mekanizmaları apoptozu baskılamak için kullanarak apoptotik ajanlara direnç geliştirebilmektedir. Bununla birlikte Bax/Bcl-2 oranı, hücre sağ kalımı için kritiktir ve Bax'daki herhangi bir artış, süreci apoptoza kaydırmaktadır [239-241]. Bunların dışında TCTP'nin hücresel ve tüm vücut hemostazını korumaya yönelik birçok biyolojik sürece katıldığı göz önünde tutulursa, TCTP düzeylerindeki anormallikler başta kanser olmak üzere bir dizi hastalığa neden olabilmektedir. Tipik olarak hem proteinin anti-apoptotik aktivitesi hem de hücre çoğalması ve bölünmesini destekleyen rolü bu etkiden sorumlu olabilir. TCTP'nin tümör dokularında yüksek ifadelenmesi kanser gelişiminin geç evrelerine katılarak invazyon ve metastaz gibi sıklıkla kötü hastalık sonucuyla ilişkilendirilmektedir. TCTP, kanser gelişimindeki birçok rolünden dolayı yeni anti-kanser stratejilerinin geliştirilmesi açısından son zamanlardaki pilot çalışmalarda potansiyel bir hedef olarak ileri sürülmektedir [242].

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, gözlenen apoptozun moleküler mekanizmalarını ortaya çıkarmak için TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve kaspaz-3 genlerinin ifade düzeyleri nicel gerçek zamanlı PZR ile, TCTP, Mcl-1, Bcl-2, Bax ve aktif kaspaz-3 protein ifadelenme düzeyleri akım sitometri ile araştırılmıştır. PGA-1 hücrelerinde DHA, kontrole göre TCTP mRNA ifade düzeyini azaltmış, Mcl-1, Bax, Bcl-2 ve kaspaz-3'ün mRNA ifade düzeylerini artırmıştır. FLU, kontrole göre TCTP ve Mcl-1'in mRNA ifade düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olmuş, Bax, Bcl-2 ve kaspaz-3 mRNA ifade düzeylerinde istatiksel anlamlı farklılık yaratmamıştır. DHA ve FLU kombinasyonu ile TCTP mRNA ifade düzeyi kontrole göre azalmış, Mcl-1 ve Bax'ın artmış, Bcl-2 ve kaspaz-3 mRNA ifade düzeylerinde ise istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. PGA-1 hücrelerinde tek başına DHA uygulanmasının TCTP protein düzeyini kontrole göre azalttığı, Mcl-1'in protein düzeyinde istatiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmadığı, Bax/Bcl-2 oranı ve aktif kaspaz-3 protein düzeylerini artırdığı akım sitometrik olarak gösterilmiştir. FLU, TCTP ve Mcl-1'in protein düzeylerini kontrole göre azaltmış, Bax/Bcl-2 oranını artırmış, aktif kaspaz-3 protein düzeyinde istatiksel anlamlı farklılık yaratmamıştır. DHA ve FLU'nun birlikte uygulanması ile TCTP ve Mcl-1'in protein düzeyleri kontrole göre azalmış, Bax/Bcl-2 oranı ve aktif kaspaz-3 protein düzeyi artmıştır.

CII hücrelerine DHA uygulanması TCTP, Mcl-1, Bax ve kaspaz-3'ün mRNA ifade düzeylerini kontrole göre artırmış, Bcl-2 ifadesini azaltmıştır. FLU hem tek başına hem de DHA ile birlikte TCTP, Mcl-1, Bax ve Kaspaz-3'ün mRNA ifade düzeylerini kontrole göre artırmış, Bcl-2'nin mRNA ifade düzeylerinde istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Akım sitometrik analiz CII hücrelerine DHA uygulanmasının TCTP, Mcl-1 ve Kaspaz-3'ün protein düzeylerini ve Bax/Bcl-2 oranını kontrole göre artırdığını göstermiştir. FLU hem tek başına hem de DHA ile birlikte TCTP ve Mcl-1 protein düzeylerini, Bax/Bcl-2 oranını kontrole göre artırırken, kaspaz-3'ün protein düzeylerinde istatiksel olarak anlamlı farklılık yaratmamıştır.

DHA'nın, MEC-1 hücrelerinde TCTP, Mcl-1, Bax, Bcl-2 ve kaspaz-3 mRNA ifade düzeylerini kontrole göre artırdığı belirlenmiştir. Tek başına FLU TCTP, Mcl-1 ve kaspaz-3 mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre istatiksel farklılık yaratmamış, Bcl-2 mRNA ifade düzeyinde azalma, Bax'da artışa yol açmıştır. DHA ve FLU kombinasyonu TCTP, Mcl-1, Bax ve kaspaz-3 mRNA ifade düzeylerini kontrole göre artırmış, Bcl-2 mRNA ifade düzeyini azaltmıştır. Akım sitometrik analiz, tek başına DHA veya FLU ile kombinasyonunun TCTP protein düzeyinde kontrole göre anlamlı farklılık saptanmamış, Mcl-1, aktif kaspaz-3 protein düzeyleri ve Bax/Bcl-2 oranında artışı göstermiştir. Tek başına FLU ile TCTP protein düzeyi kontrole göre azalmış, Mcl-1 protein düzeyi artmış, Bax, Bcl-2 ve aktif kaspaz-3 protein düzeylerinde anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Yapılan çalışmalar DHA'nın tümör hücre canlılığına olan etkisinde kanser hücre apoptozunu indüklemesinin, önemli bir mekanizma olabileceğini belirtmektedir. Hou ve ark. DHA'nın insan hepatoma hücrelerinde bizim sonuçlarımıza benzer şekilde apoptozu indüklediğini, kaspaz-3'ü aktive ettiğini ve Bax/Bcl-2 oranını artırdığını belirtmişlerdir [243]. DHA'nın özofagus kanser hücrelerinde Bcl-2 ailesi üyelerini regüle ederek ve apoptoza neden olan kaspazları aktive ederek apoptozu indüklediği gösterilmiştir [244]. Zhao ve ark. Bcl-xL'yi ifade eden veya Bcl-2'yi aşırı ifade eden akut myeloid lösemi hücrelerinde DHA ve türeviyle indüklenen apoptoza duyarlılığın azaldığını, bunun da Bcl-2/Bcl-xL inhibitörü olan ABT-737'nin uygulanmasıyla aşılabildiğini ve ABT-737 ile birlikte uygulanan DHA'nın bu hücrelerde apoptozu sinerjistik olarak indüklediğini göstermiştir [245]. Chen ve ark. çalışmamızla uyumlu olarak ART'nin, in vitro ve in vivo sıçan C6 beyin glioma modelinde doza bağlı Bax ve kaspaz-3 aktivitesini artırıp, Bcl-2 ifadelenmesini azaltarak anti-tümör etki yarattığını göstermişlerdir [246]. DHA'nın anti-

tümör etkisini pankreatik kanser hücrelerinde araştıran bir çalışma, Bcl-2 ve Bax ifadelenmesini regüle ederek, mitokondriden sitokrom-c salınmasına, ardından efektör kaspazların, kaspaz-9'u aktive ederek apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir [247]. Portier ve ark. Bcl-2'nin hücre içi lokalizasyonuna bağlı olarak hem koruyucu hem de öldürücü iki role sahip olduğunu bildirmişlerdir. Mitokondride lokalize olan Bcl-2'nin anti-apoptotik fonksiyon gördüğü kanıtlanmış olmasına karşın nükleustaki Bcl-2'nin fonksiyonunun açık olmadığını, araştırmalarının sonucunda nükleer kompartman ile ilişkili Bcl-2'nin hücreleri apoptoza götürdüğünü göstermişlerdir [248]. Baraka ve ark.nın çalışmasında aşırı Bcl-2 ifadelenmesi ile kemoterapiye zayıf yanıt ve azalmış sağ kalımı ilişkilendirmişlerdir. Yine bu çalışmada düşük Mcl-1 düzeyiyle tedaviye yanıt alınması arasında bir ilişki olabileceği saptanmış, düşük Bcl-2/Bax oranı ile tedaviye yanıt arasında anlamlı ilişkili bulunmuştur [130]. Bununla birlikte bazı araştırmacılar, KLL'de Bax ve Bcl-2 oranının apoptozun başlıca belirleyicisi olduğunu, Bax/Bcl-2'nin ölçülmesinin kemoterapi duyarlılığı hakkında bilgi verebileceğini ifade etmiştir [133]**.** KLL hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde Bax mRNA ifadelenmesi ile Bcl-2/Bax mRNA oranını sağlıklı kontrollerle karşılaştıran çalışmada Bax mRNA düzeylerini, Bcl-2 ve Bax mRNA oranını sağlıklı kontrollere göre anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur [249]. Yaptığımız çalışma DHA'nın tek başına ve FLU ile birlikte uygulanmasından sonra görülen apoptotik etkiden Bcl-2 ailesi üyelerinin rol oynadığını, özellikle Bax'ın ön plana çıktığını göstermektedir. Buradan yola çıkarak intrinsik yolak aktivasyonunun PGA-1, CII ve MEC-1 hücre apoptozundan sorumlu olduğunu söyleyebiliriz. Araştırmacılar, özgün ve direkt Bax aktivatörleri gibi yeni ve etkili küçük moleküllerin geliştirilmesinin, hem biyofarmasötik endüstride hem de akademik ortamlarda önemli bir yeri olacağını ve birçok hücresel ortamda Bax'ın temel mekanizmalarını anlamak için yeni hedefler açacağını ve kanser hastalarına yararlı tedavi rejimlerinin geliştirilmesine neden olabileceğini belirtmektelerdir [250].

TCTP'nin birçok kanser hücresinde aşırı ifadelenen anti-apoptotik bir molekül olduğu ve aşırı TCTP ifadelenen kanserlerde DHA ve türevlerinin anti-kanser ajan olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir [21, 22]. Bu bulgularla uyumlu olarak çalışmamızda DHA ve FLU'nun ayrı ayrı ve birlikte uygulanması ile PGA-1 hücrelerinde TCTP, Mcl-1 mRNA ve protein düzeyleri azalmış, CII ve MEC1 hücrelerinde ise artmıştır. Bommer ve ark. 5-FU ve oksaliplatin'e yanıt olarak HCT116 kolon kanseri hücrelerinde TCTP düzeylerinin arttığını saptaması, çalışmamızdaki CII ve MEC-1 hücre bulgularımızla

benzerlik göstermektedir. İlaçların neden olduğu sitotoksisiteye karşı hücresel stres yanıtının bir parçası olarak TCTP'nin yukarı regüle olduğu düşünülmektedir [251]. Araştırmacılar A549 akciğer kanser hücresi modelinde DHA'nın A549 akciğer kanser hücresi proliferasyonunu inhibe edebildiğini, aynı zamanda A549 hücrelerinde TCTP mRNA ifadelenmesini artırdığını, fakat protein ifadelenmesini azalttığı sonucuna varmışlardır [252]. Di Zhang ve ark. TCTP'nin yalnızca Mcl-1 ile etkileşerek TCTP'yi daha kararlı ve parçalanmaya daha az duyarlı hale geldiğini ifade etmişlerdir [146]. Araştırmacılar Mcl-1 ifadelenmesinin FLU'ya dirençli hücrelerde arttığını ve KLL'de apoptotik sürecin inhibisyonu açısından Mcl-1'in dikkat çekici proteinlerden biri olarak göründüğünü bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra bu çalışmada Bax'ın, FLU ile inkübasyondan sonra apoptotik hücrelerde görülen programlı hücre ölümünün indüklenmesinde önemli olduğu ve Bcl-2/Bax indeksinin, tek başına Bcl-2'ye göre apoptozu daha iyi gösterdiği sonucuna varmışlardır [253]. Ayrıca FLU veya Klorambusil ile tam yanıt sağlanmaması, yüksek Mcl-1 düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir [254].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda;

- PGA-1, CII ve MEC-1 kronik lenfositik lösemi hücrelerinde, DHA tek başına veya FLU ile birlikte apoptozu indüklemektedir.
- DHA tüm hücrelerde erken ve geç apoptozu arttırırken; FLU, MEC-1 dışındaki 2 hücre dizisinde apoptozu arttırmıştır. FLU'nun MEC-1 hücrelerinde etkisiz olduğu gözlemimiz, 17p delesyonu ile ilişkilendirilebilir. Daha da önemli olan FLU gibi pürin analoglarına dirençli, 17p delesyonu taşıyan MEC-1 hücrelerinde DHA tek başına apoptozu artırmıştır. Ayrıca yalnız DHA uygulanması, tek başına FLU veya DHA ile FLU kombinasyonuna göre daha etkili bulunmuştur. İlaç ve hücre dizilerine baktığımız zaman gördüğümüz ayrışmalarda, ilaçların sinerjistik ve additif etki göstermemelerinin yanında birbirlerinin etkilerini engelleyen antagonistik rolleri olabileceği dikkate alınmalıdır.
- DHA'nın tek başına ve FLU ile birlikte uygulanması tüm hücre serilerinde kaspaz-3 ifadelenmesini artırmıştır.
- DHA'nın tek başına ve FLU ile birlikte uygulanmasının genel olarak Bax ifadelenmesini artırdığı, bununla ilişkili olarak hücre dizilerinde erken ve geç apoptozun arttığı görülmüştür. Apoptozun TCTP, Mcl-1, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlere bağımlı olmadan ya da Bax etkisinin bu proteinlerin önüne geçmesi ile olduğu söylenebilir.
- Veriler, PGA-1, CII ve MEC-1 hücrelerinde görülen apoptozun intrinsik (mitokondriyal) apoptotik yolak aktivasyonu ile gerçekleştiğini düşündürmektedir.
- KLL'de Bax/Bcl-2 oranı apoptozun belirlenmesinde önemli bir faktör olarak görünmektedir.
- Bax'ın apoptoz ve ilaç direncinde belirlenen rolü, Bax aktivatörleri ve kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının önümüzdeki yıllarda ön plana çıkaracağını düşündürmüştür.

Bundan sonra;

- DHA'nın özellikle 17p delesyonu olan primer hasta hücrelerinde çalışılması
- Apoptozda rol alan diğer mekanizmaların da gözden geçirilmesi için DHA'nın daha geniş bir gen ağı üzerindeki etkilerinin incelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Hallek, M. (2017). Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American Journal of Hematology, 92*(9), 946-965.

2. Strati, P., Jain, N., and O'Brien, S. (2018). Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings, 93*(5), 651-664.

3. Kay, N. E., Hamblin, T. J., Jelinek, D. F., Dewald, G. W., Byrd, J. C., Farag, S., Lucas, M., and Lin, T. (2002). Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology-American Society of Hematology Education Program*, 193-213.

4. Dighiero, G. (2005). CLL biology and prognosis. *Hematology-American Society of Hematology Education Program*, 278-284.

5. Kipps, T. J., Stevenson, F. K., Wu, C. J., Croce, C. M., Packham, G., Wierda, W. G., O'Brien, S., Gribben, J., and Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers , 3*, 16096.

6. Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., and Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood, 46*(2), 219-234.

7. Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguet, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M. T., Monconduit, M., Belabbes, S., and Gremy, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer, 48*(1), 198-206.

8. Chiorazzi, N., Rai, K. R., and Ferrarini, M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine, 352*(8), 804-815.

9. Billard, C. (2014). Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget, 5*(2), 309-325.

10. Gomes, L. C., Evangelista, F. C. G., Sousa, L. P., Araujo, S., Carvalho, M. D. G., and Sabino, A. P. (2017). Prognosis biomarkers evaluation in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Oncology and Stem Cell Therapy, 10*(2), 57-62.

11. Wang, D., Zhong, B., Li, Y., and Liu, X. (2018). Dihydroartemisinin increases apoptosis of colon cancer cells through targeting Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Oncology Letters, 15*(2), 1949-1954.

12. Zhang, S., Shi, L., Ma, H., Li, H., Li, Y., Lu, Y., Wang, Q., and Li, W. (2017). Dihydroartemisinin induces apoptosis in human gastric cancer cell line BGC-823 through activation of JNK1/2 and p38 MAPK signaling pathways. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research, 37*(2), 174-180.

13. Liao, K., Li, J., and Wang, Z. (2014). Dihydroartemisinin inhibits cell proliferation via AKT/GSK3beta/cyclinD1 pathway and induces apoptosis in A549 lung cancer cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology , 7*(12), 8684-8691.

14. Hu, C. J., Zhou, L., and Cai, Y. (2014). Dihydroartemisinin induces apoptosis of cervical cancer cells via upregulation of RKIP and downregulation of bcl-2. *Cancer Biology & Therapy, 15*(3), 279-288.

15. Mao, H., Gu, H., Qu, X., Sun, J., Song, B., Gao, W., Liu, J., and Shao, Q. (2013). Involvement of the mitochondrial pathway and Bim/Bcl-2 balance in dihydroartemisinin-induced apoptosis in human breast cancer in vitro. *International Journal of Molecular Medicine, 31*(1), 213-218.

16. Chen, T., Li, M., Zhang, R., and Wang, H. (2009). Dihydroartemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 13*(7), 1358-1370.

17. Bommer, U. A. (2017). The Translational Controlled Tumour Protein TCTP: Biological Functions and Regulation. *Results and Problems in Cell Differentiation, 64*, 69-126.

18. Acunzo, J., Baylot, V., So, A., and Rocchi, P. (2014). TCTP as therapeutic target in cancers. *Cancer Treatment Reviews, 40*(6), 760-769.

19. Koziol, M. J., and Gurdon, J. B. (2012). TCTP in development and cancer. *Biochemistry Research International, 2012*, 105203.

20. Susini, L., Besse, S., Duflaut, D., Lespagnol, A., Beekman, C., Fiucci, G., Atkinson, A. R., Busso, D., Poussin, P., Marine, J. C., Martinou, J. C., Cavarelli, J., Moras, D., Amson, R., and Telerman, A. (2008). TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death & Differentiation, 15*(8), 1211-1220.

21. Lucibello, M., Adanti, S., Antelmi, E., Dezi, D., Ciafre, S., Carcangiu, M. L., Zonfrillo, M., Nicotera, G., Sica, L., De Braud, F., and Pierimarchi, P. (2015). Phospho-TCTP as a therapeutic target of Dihydroartemisinin for aggressive breast cancer cells. *Oncotarget, 6*(7), 5275-5291.

22. Fujita, T. F. K., Pinkaew, D., Hutadilok-Towatana, N., Liu, Z. and Fujise, K. (2008). Human fortilin is a molecular target of dihydroartemisinin. *FEBS Letters, 582*(7), 1055-1060.

23. Delves, P. J., and Roitt, I.M. (2000). The immune system. First of two parts. *New England Journal of Medicine, 343*, 37-49.

24. Naradikian, M.S., Scholz, J.L., Oropallo, M.A., and Cancro, M.P. (2014). Understanding B Cell Biology. In X. Bosch (Ed.), *Drugs Targeting B-Cells in Autoimmune Diseases, Milestones in Drug Therapy* (11-35). Springer Basel.

25. Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 131*(4), 959-971.

26. Busslinger, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annual Review of Immunology, 22*, 55-79.

27. Dorshkind, K. (2002). Multilineage development from adult bone marrow cells. *Nature Immunology, 3*(4), 311-313.

28. Georgopoulos, K. (2002). Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nature Reviews of Immunology, 2*(3), 162-174.

29. Pang, S. H. M., de Graaf, C. A., Hilton, D. J., Huntington, N. D., Carotta, S., Wu, L., and Nutt, S. L. (2018). PU.1 Is Required for the Developmental Progression of Multipotent Progenitors to Common Lymphoid Progenitors. *Frontiers in Immunology, 9*, 1264.

30. Warren, L. A., and Rothenberg, E. V. (2003). Regulatory coding of lymphoid lineage choice by hematopoietic transcription factors. *Current Opinion in Immunology, 15*(2), 166-175.

31. Rothenberg, E. V., and Pant, R. (2004). Origins of lymphocyte developmental programs: transcription factor evidence. *Semin Immunol, 16*(4), 227-238.

32. Nutt, S. L., and Kee, B. L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity, 26*(6), 715-725.

33. Cobaleda, C., Jochum, W., and Busslinger, M. (2007). Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature, 449*(7161), 473-477.

34. Medvedovic, J., Ebert, A., Tagoh, H., and Busslinger, M. (2011). Pax5: a master regulator of B cell development and leukemogenesis. *Advances in Immunology, 111*, 179-206.

35. Li, J., Wan, Y., Ji, Q., Fang, Y., and Wu, Y. (2013). The role of microRNAs in B-cell development and function. *Cellular & Molecular Immunology, 10*(2), 107-112.

36. De Yebenes, V. G., Bartolome-Izquierdo, N., and Ramiro, A. R. (2013). Regulation of B-cell development and function by microRNAs. *Immunological Reviews, 253*(1), 25-39.

37. Bemark, M. (2015). Translating transitions - how to decipher peripheral human B cell development. *Journal of Biomedical Research, 29*(4), 264-284.

38. Tavian, M., and Peault, B. (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. *International Journal of Developmental Biology, 49*(2-3), 243-250.

39. Boller, S., and Grosschedl, R. (2014). The regulatory network of B-cell differentiation: a focused view of early B-cell factor 1 function. *Immunological Reviews, 261*(1), 102-115.

40. Vale, A. M., Kearney, J. F., Nobrega, A., and Schroeder, H. W. (2015). Development and Function of B Cell Subsets. In W.A. Frederick, H. Tasuku, R. Andreas and R. Michael (Eds.), *Molecular Biology of B cells*, 2nd Edition, 99-119.

41. Rothenberg, E. V. (2016). Multiple Curricula for B Cell Developmental Programming. *Immunity, 45*(3), 457-458.

42. LeBien, T. W., and Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood, 112*(5), 1570-1580.

43. Abbas, A.K., Lichtman, H.A., Pillai, S. (2011). Lymphocyte Development and Antigen Receptor Gene Rearrangement *Cellular and Molecular Immunology* (7th ed.), Philadelphia: Saunders an Elsevier, 173-202.

44. Busslinger, M., and Tarakhovsky, A. (2014). Epigenetic control of immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 6*(6).

45. Murphy, K. M. (2007). The Development and Survival of Lymphocytes. In P. T. Kenneth M. Murphy, Mark Walport (Ed.), *Janeway's Immunobiology* (7th ed.), Garland Science, 257-320.

46. Goldsby, R. A., Kindt, T.J., Kuby, J., anmd Osborne, B. A. (2002). *Immunology* (5th ed.): W. H. Freeman, 113-135.

47. Komori, T., Okada, A., Stewart, V., and Alt, F. W. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science, 261*(5125), 1171-1175.

48. Sakaguchi, N., and Melchers, F. (1986). Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature, 324*(6097), 579-582.

49. Parker, M. J., Licence, S., Erlandsson, L., Galler, G. R., Chakalova, L., Osborne, C. S., Morgan, G., Fraser, P., Jumaa, H., Winkler, T. H., Skok, J., and Martensson, I. L. (2005). The pre-B-cell receptor induces silencing of VpreB and lambda5 transcription. *EMBO Journal, 24*(22), 3895-3905.

50. Tsukada, S., Saffran, D. C., Rawlings, D. J., Parolini, O., Allen, R. C., Klisak, I., Sparkes, R. S., Kubagawa, H., Mohandas, T., Quan, S., Belmont, J.W., Cooper, M.D., Conley, M.E. and Witte, O.N. (1993). Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell, 72*(2), 279-290.

51. Hendriks, R. W., de Bruijn, M. F., Maas, A., Dingjan, G. M., Karis, A., and Grosveld, F. (1996). Inactivation of Btk by insertion of lacZ reveals defects in B cell development only past the pre-B cell stage. *EMBO Journal, 15*(18), 4862-4872.

52. Pal Singh, S., Dammeijer, F., and Hendriks, R. W. (2018). Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Molecular Cancer, 17*(1), 57.

53. Herzog, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nature Reviews Immunology, 9*(3), 195-205.

54. Vettermann, C., and Schlissel, M. S. (2010). Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunological Reviews, 237*(1), 22-42.

55. Kalmanovich, G., and Mehr, R. (2003). Models for antigen receptor gene rearrangement. III. Heavy and light chain allelic exclusion. *Journal of Immunology, 170*(1), 182-193.

56. Neuberger, M. S., Caskey, H. M., Pettersson, S., Williams, G. T., and Surani, M. A. (1989). Isotype exclusion and transgene down-regulation in immunoglobulin-lambda transgenic mice. *Nature, 338*(6213), 350-352.

57. Nemazee, D. (2017). Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nature Reviews Immunology, 17*(5), 281-294.

58. Aurrand-Lions, M., and Mancini, S. J. C. (2018). Murine Bone Marrow Niches from Hematopoietic Stem Cells to B Cells. *International Journal of Molecular Sciences, 19*(8).

59. Maity, P. C., Blount, A., Jumaa, H., Ronneberger, O., Lillemeier, B. F., and Reth, M. (2015). B cell antigen receptors of the IgM and IgD classes are clustered in different protein islands that are altered during B cell activation. *Science Signaling, 8*(394), ra93.

60. Dorshkind, K., and Montecino-Rodriguez, E. (2007). Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nature Reviews Immunology, 7*(3), 213-219.

61. Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A. K., and Rizzi, M. (2014). B cell biology: an overview. *Current Allergy and Asthma Reports, 14*(5), 434.

62. Victora, G. D., and Nussenzweig, M. C. (2012). Germinal centers. *Annual Review of Immunology, 30*, 429-457.

63. Allen, C. D., Okada, T., and Cyster, J. G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity, 27*(2), 190-202.

64. Allen, C. D., Okada, T., Tang, H. L., and Cyster, J. G. (2007). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science, 315*(5811), 528-531.

65. Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell, 102*(5), 553-563.

66. Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A. G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L. D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A., and Durandy, A. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell, 102*(5), 565-575.

67. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer, 26*(4), 239-257.

68. Norbury, C. J., and Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 41*, 367-401.

69. Lawen, A. (2003). Apoptosis-an introduction. *Bioessays, 25*(9), 888-896.

70. Güleş, Ö. ve Eren, Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2*, 73-78.

71. Riedl, S. J., and Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8*(5), 405-413.

72. Ledgerwood, E. C., and Morison, I. M. (2009). Targeting the apoptosome for cancer therapy. *Clinical Cancer Research, 15*(2), 420-424.

73. Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology, 36*, 489-517.

74. Czerski, L., and Nunez, G. (2004). Apoptosome formation and caspase activation: is it different in the heart? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 37*(3), 643-652.

75. Pfeffer, C. M., and Singh, A. T. K. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences, 19*(2).

76. Yuan, S., and Akey, C. W. (2013). Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure, 21*(4), 501-515.

77. Zhou, M., Li, Y., Hu, Q., Bai, X. C., Huang, W., Yan, C., Scheres, S. H., and Shi, Y. (2015). Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes & Development, 29*(22), 2349-2361.

78. Adams, C. M., Clark-Garvey, S., Porcu, P., and Eischen, C. M. (2018). Targeting the Bcl-2 Family in B Cell Lymphoma. *Frontiers in Oncology, 8*, 636.

79. Rousalova, I., and Krepela, E. (2010). Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review). *International Journal of Oncology, 37*(6), 1361-1378.

80. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology, 35*(4), 495-516.

81. Peter, M. E., and Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death & Differentiation, 10*(1), 26-35.

82. Pennarun, B., Meijer, A., de Vries, E. G., Kleibeuker, J. H., Kruyt, F., and de Jong, S. (2010). Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta, 1805*(2), 123-140.

83. Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B., and Walczak, H. (2007). TRAIL signalling: decisions between life and death. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39*(7-8), 1462-1475.

84. Riedl, S. J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 5*(11), 897-907.

85. Pop, C., and Salvesen, G. S. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *Journal of Biological Chemistry, 284*(33), 21777-21781.

86. Fischer, U., Stroh, C., and Schulze-Osthoff, K. (2006). Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene, 25*(1), 152-159.

87. Billen, L. P., Shamas-Din, A., and Andrews, D. W. (2008). Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene,* 27(1), 93-104.

88. Kantari, C., and Walczak, H. (2011). Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica at Biophysica Acta, 1813*(4), 558-563.

89. Schug, Z. T., Gonzalvez, F., Houtkooper, R. H., Vaz, F. M., and Gottlieb, E. (2011). BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death & Differentiation, 18*(3), 538-548.

90. Cuvillier, O., Edsall, L., and Spiegel, S. (2000). Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *Journal of Biological Chemistry, 275*(21), 15691-15700.

91. Patwardhan, G. A., Beverly, L. J., and Siskind, L. J. (2016). Sphingolipids and mitochondrial apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 48*(2), 153-168.

92. Satram-Hoang, S., Reyes, C., Hoang, K. Q., Momin, F., and Skettino, S. (2014). Treatment practice in the elderly patient with chronic lymphocytic leukemia-analysis of the combined SEER and Medicare database. *Annals of Hematology, 93*(8), 1335-1344.

93. Nabhan, C., Ollberding, N. J., Villines, D., Chiu, B. C., Caces, D. B., Valdez, T. V., Ghielmini, M., Hsu Schmitz, S. F., and Smith, S. M. (2014). A systematic review of comparative schedule-related toxicities with maintenance rituximab in follicular and mantle cell lymphomas. *Leukemia & Lymphoma, 55*(6), 1288-1294.

94. Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H., Hillmen, P., Keating, M. J., Montserrat, E., Rai, K. R., Kipps, T. J., and International Workshop on Chronic Lymphocytic, L. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood, 111*(12), 5446-5456.

95. Cramer, P., and Hallek, M. (2011). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nature Reviews Clinical Oncology, 8*(1), 38-47.

96. Kronik Lenfositik Lösemi. (2012) *Ulusal Tanı ve Tedavi Kılavuzu*, I. Bölüm, Türk Hematoloji Derneği, 1-18.

97. Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., and Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood, 94*(6), 1848-1854.

98. Ghia, P., Stamatopoulos, K., Belessi, C., Moreno, C., Stella, S., Guida, G., Michel, A., Crespo, M., Laoutaris, N., Montserrat, E., Anagnostopoulos, A., Dighiero, G., Fassas, A., Caligaris-Cappio, F., and Davi, F. (2005). Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood, 105*(4), 1678-1685.

99. Rassenti, L. Z., Jain, S., Keating, M. J., Wierda, W. G., Grever, M. R., Byrd, J. C., Kay, N. E., Brown, J. R., Gribben, J. G., Neuberg, D. S., He, F., Greaves, A. W., Rai, K. R., and Kipps, T. J. (2008). Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, 112*(5), 1923-1930.

100. Bulian, P., Shanafelt, T. D., Fegan, C., Zucchetto, A., Cro, L., Nuckel, H., Baldini, L., Kurtova, A. V., Ferrajoli, A., Burger, J. A., Gaidano, G., Del Poeta, G., Pepper, C., Rossi, D., and Gattei, V. (2014). CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology, 32*(9), 897-904.

101. Chiorazzi, N., and Ferrarini, M. (2003). B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol, 21*, 841-894.

102. Stevenson, F. K., and Caligaris-Cappio, F. (2004). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood, 103*(12), 4389-4395.

103. Burger, J. A., and Chiorazzi, N. (2013). B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends in Immunology, 34*(12), 592-601.

104. Liu, Y., Wang, Y., Yang, J., Bi, Y., and Wang, H. (2018). ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia: A meta-analysis. *Clinica Chimica Acta, 483*, 82-88.

105. Chen, L., Huynh, L., Apgar, J., Tang, L., Rassenti, L., Weiss, A., and Kipps, T. J. (2008). ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, 111*(5), 2685-2692.

106. Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, 94*(6), 1840-1847.

107. Deaglio, S., Morra, M., Mallone, R., Ausiello, C. M., Prager, E., Garbarino, G., Dianzani, U., Stockinger, H., and Malavasi, F. (1998). Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *Journal of Immunology, 160*(1), 395-402.

108. Malavasi, F., Deaglio, S., Damle, R., Cutrona, G., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (2011). CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood, 118*(13), 3470-3478.

109. Deaglio, S., Capobianco, A., Bergui, L., Durig, J., Morabito, F., Duhrsen, U., and Malavasi, F. (2003). CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood, 102*(6), 2146-2155.

110. Shanafelt, T. D., Geyer, S. M., Bone, N. D., Tschumper, R. C., Witzig, T. E., Nowakowski, G. S., Zent, C. S., Call, T. G., Laplant, B., Dewald, G. W., Jelinek, D. F., and Kay, N. E. (2008). CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *British Journal of Haematology, 140*(5), 537-546.

111. Rossi, D., Zucchetto, A., Rossi, F. M., Capello, D., Cerri, M., Deambrogi, C., Cresta, S., Rasi, S., De Paoli, L., Bodoni, C. L., Bulian, P., Del Poeta, G., Ladetto, M., Gattei, V., and Gaidano, G. (2008). CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica, 93*(10), 1575-1579.

112. Kostareli, E., Smilevska, T., Stamatopoulos, K., Kouvatsi, A., and Anagnostopoulos, A. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia: an immunobiology approach. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo, 136*(5-6), 319-323.

113. Stevenson, F. K., Krysov, S., Davies, A. J., Steele, A. J., and Packham, G. (2011). B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, 118*(16), 4313-4320.

114. Matolcsy, A., Casali, P., Nador, R. G., Liu, Y. F., and Knowles, D. M. (1997). Molecular characterization of IgA- and/or IgG-switched chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood, 89*(5), 1732-1739.

115. Sagatys, E. M., and Zhang, L. (2012). Clinical and laboratory prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Control, 19*(1), 18-25.

116. Rozovski, U., Keating, M. J., and Estrov, Z. (2018). Why Is the Immunoglobulin Heavy Chain Gene Mutation Status a Prognostic Indicator in Chronic Lymphocytic Leukemia? *Acta Haematologica, 140*(1), 51-54.

117. Mockridge, C. I., Potter, K. N., Wheatley, I., Neville, L. A., Packham, G., and Stevenson, F. K. (2007). Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood, 109*(10), 4424-4431.

118. Dühren-von Minden, M., Übelhart, R., Schneider, D., Wossning, T., Bach, M. P., Buchner, M., Hofmann, D., Surova, E., Follo, M., and Köhler, F. (2012). Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature, 489*(7415), 309.

119. Awan, F. T., and Byrd, J. C. (2014). New strategies in chronic lymphocytic leukemia: shifting treatment paradigms. *Clinical Cancer Research, 20*(23), 5869-5874.

120. Yarkoni, Y., Getahun, A., and Cambier, J. C. (2010). Molecular underpinning of B-cell anergy. *Immunological reviews, 237*(1), 249-263.

121. Getahun, A., Beavers, N. A., Larson, S. R., Shlomchik, M. J., and Cambier, J. C. (2016). Continuous inhibitory signaling by both SHP-1 and SHIP-1 pathways is required to maintain unresponsiveness of anergic B cells. *Journal of Experimental Medicine, 213*(5), 751-769.

122. O'neill, S. K., Getahun, A., Gauld, S. B., Merrell, K. T., Tamir, I., Smith, M. J., Dal Porto, J. M., Li, Q.Z., and Cambier, J. C. (2011). Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM motifs initiates a SHIP-1 phosphatase-mediated inhibitory signaling cascade required for B cell anergy. *Immunity, 35*(5), 746-756.

123. Packham, G., Krysov, S., Allen, A., Savelyeva, N., Steele, A. J., Forconi, F., and Stevenson, F. K. (2014). The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy. *Haematologica, 99*(7), 1138-1148.

124. Queirós, A. C., Villamor, N., Clot, G., Martinez-Trillos, A., Kulis, M., Navarro, A., Penas, E. M. M., Jayne, S., Majid, A., and Richter, J. (2015). A B-cell epigenetic signature defines three biologic subgroups of chronic lymphocytic leukemia with clinical impact. *Leukemia, 29*(3), 598.

125. de Rooij, M. F., Kuil, A., Geest, C. R., Eldering, E., Chang, B. Y., Buggy, J. J., Pals, S. T., and Spaargaren, M. (2012). The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor–and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, 119*(11), 2590-2594.

126. Vlad, A., Deglesne, P.-A., Letestu, R., Saint-Georges, S., Chevallier, N., Baran-Marszak, F., Varin-Blank, N., Ajchenbaum-Cymbalista, F., and Ledoux, D. (2009). Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer research, 69*(16), 6387-6395.

127. Quiroga, M. P., Balakrishnan, K., Kurtova, A. V., Sivina, M., Keating, M. J., Wierda, W. G., Gandhi, V., and Burger, J. A. (2009). B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood, 114*(5), 1029-1037.

128. Hallek, M., Shanafelt, T. D., and Eichhorst, B. (2018). Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet, 391*(10129), 1524-1537.

129. Eichhorst, B., Dreyling, M., Robak, T., Montserrat, E., Hallek, M., and Group, E. G. W. (2011). Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology,* 22(6), 50-54.

130. Baraka, A., El Shorbagy, S., Elfarargy, O.M., Haggag, R., Abdelaziz, L.A., Elsayed, S.F., Elbana, K.A. (2017). Prognostic Significance of Apoptosis Regulators in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Cancer Therapy, 8*(4), 360-385.

131. Scarfo, L., and Ghia, P. (2013). Reprogramming cell death: BCL2 family inhibition in hematological malignancies. *Immunology Letters, 155*(1-2), 36-39.

132. Pepper, C., Hoy, T., and Bentley, D. P. (1997). Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *British Journal of Cancer, 76*(7), 935-938.

133. Del Principe, M. I., Dal Bo, M., Bittolo, T., Buccisano, F., Rossi, F. M., Zucchetto, A., Rossi, D., Bomben, R., Maurillo, L., Cefalo, M., De Santis, G., Venditti, A., Gaidano, G., Amadori, S., de Fabritiis, P., Gattei, V., and Del Poeta, G. (2016). Clinical significance of bax/bcl-2 ratio in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica, 101*(1), 77-85.

134. Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., and Dono, M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 102*(39), 13944-13949.

135. Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., and Reed, J. C. (1993). bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood, 82*(6), 1820-1828.

136. Pepper, C., Lin, T. T., Pratt, G., Hewamana, S., Brennan, P., Hiller, L., Hills, R., Ward, R., Starczynski, J., and Austen, B. (2008). Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood, 112*(9), 3807-3817.

137. Gandhi, V., Balakrishnan, K., and Chen, L. S. (2008). Mcl-1: the 1 in CLL. *Blood, 112*(9), 3538-3540.

138. Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T., and Bommer, U.-A. (1999). The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *Journal of Cell Science, 112*(8), 1257-1271.

139. Bheekha-Escura, R., MacGlashan, D. W., Langdon, J. M., and MacDonald, S. M. (2000). Human recombinant histamine-releasing factor activates human eosinophils and the eosinophilic cell line, AML14-3D10. *Blood, 96*(6), 2191-2198.

140. MacDonald, S. M. (2012). Potential role of histamine releasing factor (HRF) as a therapeutic target for treating asthma and allergy. *Journal of Asthma and Allergy, 5*, 51.

141. Bommer, U. A., and Thiele, B. J. (2004). The translationally controlled tumour protein (TCTP). *International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36*(3), 379-385.

142. Baylot, V., Katsogiannou, M., Andrieu, C., Taieb, D., Acunzo, J., Giusiano, S., Fazli, L., Gleave, M., Garrido, C., and Rocchi, P. (2012). Targeting TCTP as a new therapeutic strategy in castration-resistant prostate cancer. *Molecular Therapy, 20*(12), 2244-2256.

143. Pinkaew, D., and Fujise, K. (2017). Fortilin: A Potential Target for the Prevention and Treatment of Human Diseases. *Adv Clin Chem, 82*, 265-300.

144. Nagano-Ito, M., and Ichikawa, S. (2012). Biological effects of Mammalian translationally controlled tumor protein (TCTP) on cell death, proliferation, and tumorigenesis. *Biochemistry Research International, 2012*, 204960.

145. Yang, Y., Yang, F., Xiong, Z., Yan, Y., Wang, X., Nishino, M., Mirkovic, D., Nguyen, J., Wang, H., and Yang, X. F. (2005). An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene, 24*(30), 4778-4788.

146. Zhang, D., Li, F., Weidner, D., Mnjoyan, Z. H., and Fujise, K. (2002). Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *Journal of Biological Chemistry, 277*(40), 37430-37438.

147. Liu, H., Peng, H.-W., Cheng, Y.-S., Yuan, H. S. and Yang-Yen, H.-F. (2005). Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Molecular and Cellular Biology, 25*(8), 3117-3126.

148. Kayhan, H. (2010). *Kronik Lenfositik Lösemide TCTP/HRF ve Mcl-1'in ifadelenmesi*, Yayımlanmamış Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 107.

149. Susini, L., Besse, S., Duflaut, D., Lespagnol, A., Beekman, C., Fiucci, G., Atkinson, A. R., Busso, D., Poussin, P., Marine, J. C., Martinou, J. C., Cavarelli, J., Moras, D., Amson, R., and Telerman, A. (2008). TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death And Differentiation, 15*, 1211.

150. Graidist, P., Yazawa, M., Tonganunt, M., Nakatomi, A., Lin, C. C., Chang, J. Y., Phongdara, A., and Fujise, K. (2007). Fortilin binds Ca2+ and blocks Ca2+-dependent apoptosis in vivo. *Biochemical Journal, 408*(2), 181-191.

151. Williams, A. B., and Schumacher, B. (2016). p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 6*(5).

152. Rho, S. B., Lee, J. H., Park, M. S., Byun, H. J., Kang, S., Seo, S. S., Kim, J. Y., and Park, S. Y. (2011). Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53. *FEBS Letters, 585*(1), 29-35.

153. Chen, Y., Fujita, T., Zhang, D., Doan, H., Pinkaew, D., Liu, Z., Wu, J., Koide, Y., Chiu, A., Lin, C. C., Chang, J. Y., Ruan, K. H., and Fujise, K. (2011). Physical and functional antagonism between tumor suppressor protein p53 and fortilin, an anti-apoptotic protein. *Journal of Biological Chemistry, 286*(37), 32575-32585.

154. Zhang, X.G., Li, G.X., Zhao, S.S., Xu, F.L., Wang, Y.H., and Wang, W. (2014). A review of dihydroartemisinin as another gift from traditional Chinese medicine not only for malaria control but also for schistosomiasis control. *Parasitology Research, 113*(5), 1769-1773.

155. Klayman, D. L. (1985). Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science, 228*(4703), 1049-1055.

156. Borstnik, K., Paik, I. H., Shapiro, T. A., and Posner, G. H. (2002). Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds. *International Journal of Parasitology, 32*(13), 1661-1667.

157. White, N., and Olliaro, P. (1998). Artemisinin and derivatives in the treatment of uncomplicated malaria. *Médecine tropicale: Revue du Corps de Santé Colonial, 58*(3), 54-56.

158. Ho, W. E., Peh, H. Y., Chan, T. K., and Wong, W. F. (2014). Artemisinins: pharmacological actions beyond anti-malarial. *Pharmacology & Therapeutics, 142*(1), 126-139.

159. Konstat-Korzenny, E., Ascencio-Aragon, J. A., Niezen-Lugo, S., and Vazquez-Lopez, R. (2018). Artemisinin and Its Synthetic Derivatives as a Possible Therapy for Cancer. *Medical Sciences (Basel), 6*(1).

160. Shao, Y. Y., Zhang, T. L., Wu, L. X., Zou, H. C., Li, S., Huang, J., and Zhou, H. H. (2017). AKT Axis, miR-21, and RECK Play Pivotal Roles in Dihydroartemisinin Killing Malignant Glioma Cells. *International Journal of Molecular Sciences, 18*(2).

161. Singh, N. P., and Lai, H. (2001). Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sciences, 70*(1), 49-56.

162. Tong, Y., Liu, Y., Zheng, H., Zheng, L., Liu, W., Wu, J., Ou, R., Zhang, G., Li, F., Hu, M., Liu, Z., and Lu, L. (2016). Artemisinin and its derivatives can significantly inhibit lung tumorigenesis and tumor metastasis through Wnt/beta-catenin signaling. *Oncotarget, 7*(21), 31413-31428.

163. Liu, Y., Gao, S., Zhu, J., Zheng, Y., Zhang, H., and Sun, H. (2018). Dihydroartemisinin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration, and invasion in epithelial ovarian cancer via inhibition of the hedgehog signaling pathway. *Cancer Medicine, 7*(11), 5704-5715.

164. Li, Y., Wang, Y., Kong, R., Xue, D., Pan, S., Chen, H., and Sun, B. (2016). Dihydroartemisinin suppresses pancreatic cancer cells via a microRNA-mRNA regulatory network. *Oncotarget, 7*(38), 62460-62473.

165. Cao, J. T., Mo, H. M., Wang, Y., Zhao, K., Zhang, T. T., Wang, C. Q., Xu, K. L., and Han, Z. H. (2018). Dihydroartemisinin-induced apoptosis in human acute monocytic leukemia cells. *Oncology Letters, 15*(3), 3178-3184.

166. Zhang, C. Z., Zhang, H., Yun, J., Chen, G. G., and Lai, P. B. (2012). Dihydroartemisinin exhibits antitumor activity toward hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Biochemical Pharmacology, 83*(9), 1278-1289.

167. Sun, H., Meng, X., Han, J., Zhang, Z., Wang, B., Bai, X., and Zhang, X. (2013). Anti-cancer activity of DHA on gastric cancer--an in vitro and in vivo study. *Tumour Biology, 34*(6), 3791-3800.

168. Paccez, J. D., Duncan, K., Sekar, D., Correa, R. G., Wang, Y., Gu, X., Bashin, M., Chibale, K., Libermann, T. A., and Zerbini, L. F. (2019). Dihydroartemisinin inhibits prostate cancer via JARID2/miR-7/miR-34a-dependent downregulation of Axl. *Oncogenesis, 8*(3), 14.

169. Wang, L., Li, J., Shi, X., Li, S., Tang, P. M., Li, Z., Li, H., and Wei, C. (2019). Antimalarial Dihydroartemisinin triggers autophagy within HeLa cells of human cervical cancer through Bcl-2 phosphorylation at Ser70. *Phytomedicine, 52*, 147-156.

170. Li, Z., Li, Q., Wu, J., Wang, M., and Yu, J. (2016). Artemisinin and its derivatives as a repurposing anticancer agent: What else do we need to do? *Molecules, 21*(10), 1331.

171. Crespo-Ortiz, M. P., and Wei, M. Q. (2011). Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. *BioMed Research International, 2012*.

172. Shen, J., Sheng, X., Chang, Z., Wu, Q., Wang, S., Xuan, Z., Li, D., Wu, Y., Shang, Y., and Kong, X. (2014). Iron metabolism regulates p53 signaling through direct heme-p53 interaction and modulation of p53 localization, stability, and function. *Cell Reports, 7*(1), 180-193.

173. Ba, Q., Zhou, N., Duan, J., Chen, T., Hao, M., Yang, X., Li, J., Yin, J., Chu, R., and Wang, H. (2012). Dihydroartemisinin exerts its anticancer activity through depleting cellular iron via transferrin receptor-1. *PLoS One, 7*(8), e42703.

174. Qu, C., Ma, J., Liu, X., Xue, Y., Zheng, J., Liu, L., Liu, J., Li, Z., Zhang, L., and Liu, Y. (2017). Dihydroartemisinin exerts anti-tumor activity by inducing mitochondrion and endoplasmic reticulum apoptosis and autophagic cell death in human glioblastoma cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience, 11*, 310.

175. Lu, M., Sun, L., Zhou, J., and Yang, J. (2014). Dihydroartemisinin induces apoptosis in colorectal cancer cells through the mitochondria-dependent pathway. *Tumour Biology, 35*(6), 5307-5314.

176. Wang, S. J., Gao, Y., Chen, H., Kong, R., Jiang, H. C., Pan, S. H., Xue, D. B., Bai, X. W., and Sun, B. (2010). Dihydroartemisinin inactivates NF-kappaB and potentiates the anti-tumor effect of gemcitabine on pancreatic cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Letters, 293*(1), 99-108.

177. Chen, H., Sun, B., Wang, S., Pan, S., Gao, Y., Bai, X., and Xue, D. (2010). Growth inhibitory effects of dihydroartemisinin on pancreatic cancer cells: involvement of cell cycle arrest and inactivation of nuclear factor-kappaB. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 136*(6), 897-903.

178. Jiao, Y., Ge, C. M., Meng, Q. H., Cao, J. P., Tong, J., and Fan, S. J. (2007). Dihydroartemisinin is an inhibitor of ovarian cancer cell growth. *Acta Pharmacologica Sinica, 28*(7), 1045-1056.

179. Efferth, T. (2017). From ancient herb to modern drug: Artemisia annua and artemisinin for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology, 46*, 65-83.

180. Zhang, Y., Xu, G., Zhang, S., Wang, D., Saravana Prabha, P., and Zuo, Z. (2018). Antitumor Research on Artemisinin and Its Bioactive Derivatives. *Natural Products and Bioprospecting, 8*(4), 303-319.

181. Qu, C., Ma, J., Liu, X., Xue, Y., Zheng, J., Liu, L., Liu, J., Li, Z., Zhang, L., and Liu, Y. (2017). Dihydroartemisinin Exerts Anti-Tumor Activity by Inducing Mitochondrion and Endoplasmic Reticulum Apoptosis and Autophagic Cell Death in Human Glioblastoma Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience, 11*, 310.

182. Zhang, Z. S., Wang, J., Shen, Y. B., Guo, C. C., Sai, K. E., Chen, F. R., Mei, X., Han, F. U., and Chen, Z. P. (2015). Dihydroartemisinin increases temozolomide efficacy in glioma cells by inducing autophagy. *Oncology Letters, 10*(1), 379-383.

183. Hu, W., Chen, S. S., Zhang, J. L., Lou, X. E., and Zhou, H. J. (2014). Dihydroartemisinin induces autophagy by suppressing NF-kappaB activation. *Cancer Letters, 343*(2), 239-248.

184. Zhang, Z., Yao, Z., Zhao, S., Shao, J., Chen, A., Zhang, F., and Zheng, S. (2017). Interaction between autophagy and senescence is required for dihydroartemisinin to alleviate liver fibrosis. *Cell Death & Disease, 8*(6), e2886.

185. Zhang, Z., Guo, M., Zhao, S., Shao, J., and Zheng, S. (2016). ROS-JNK1/2-dependent activation of autophagy is required for the induction of anti-inflammatory effect of dihydroartemisinin in liver fibrosis. *Free Radical Biology & Medicine,* 101, 272-283.

186. Sun, X., Yan, P., Zou, C., Wong, Y. K., Shu, Y., Lee, Y. M., Zhang, C., Yang, N. D., Wang, J., and Zhang, J. (2019). Targeting autophagy enhances the anticancer effect of artemisinin and its derivatives. *Medicinal Research Reviews*, 1-22.

187. Liu, Y., Wang, W., Xu, J., Li, L., Dong, Q., Shi, Q., Zuo, G., Zhou, L., Weng, Y., Tang, M., He, T., and Luo, J. (2013). Dihydroartemisinin inhibits tumor growth of human osteosarcoma cells by suppressing Wnt/beta-catenin signaling. *Oncology Reports, 30*(4), 1723-1730.

188. Hui, H. Y., Wu, N., Wu, M., Liu, Y., Xiao, S. X., and Zhang, M. F. (2016). Dihydroartemisinin suppresses growth of squamous cell carcinoma A431 cells by targeting the Wnt/beta-catenin pathway. *Anticancer Drugs*, *27*(2), 99-105.

189. Lee, J., Zhang, G., Wu, X., Xu, F., Zhou, J., and Zhang, X. (2012). Growth inhibitory effect of dihydroartemisinin on Bcr/Abl+ chronic myeloid leukemia K562 cells involve AKT, ERK and NF-κB modulation. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 138*(12), 2095-2102.

190. Konkimalla, V. B., McCubrey, J. A., and Efferth, T. (2009). The role of downstream signaling pathways of the epidermal growth factor receptor for Artesunate's activity in cancer cells. *Current Cancer Drug Targets, 9*(1), 72-80.

191. Sertel, S., Eichhorn, T., Simon, C. H., Plinkert, P. K., Johnson, S. W., and Efferth, T. (2010). Pharmacogenomic identification of c-Myc/Max-regulated genes associated with cytotoxicity of artesunate towards human colon, ovarian and lung cancer cell lines. *Molecules, 15*(4), 2886-2910.

192. Jin, H., Jiang, A. Y., Wang, H., Cao, Y., Wu, Y., and Jiang, X. F. (2017). Dihydroartemisinin and gefitinib synergistically inhibit NSCLC cell growth and promote apoptosis via the Akt/mTOR/STAT3 pathway. *Molecular Medicine Reports, 16*(3), 3475-3481.

193. Dong, F., Zhou, X., Li, C., Yan, S., Deng, X., Cao, Z., Li, L., Tang, B., Allen, T. D., and Liu, J. (2014). Dihydroartemisinin targets VEGFR2 via the NF-kappaB pathway in endothelial cells to inhibit angiogenesis. *Cancer Biology & Therapy, 15*(11), 1479-1488.

194. Li, Z., Ding, X., Wu, H., and Liu, C. (2019). Artemisinin inhibits angiogenesis by regulating p38 MAPK/CREB/TSP-1 signaling pathway in osteosarcoma. *Journal of Cellular Biochemistry, 120*(7), 11462-11470.

195. Bhisutthibhan, J., and Meshnick, S. R. (2001). Immunoprecipitation of [3H] dihydroartemisinin translationally controlled tumor protein (TCTP) adducts from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by using anti-TCTP antibodies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45*(8), 2397-2399.

196. Lucibello, M., Adanti, S., Antelmi, E., Dezi, D., Ciafrè, S., Carcangiu, M. L., Zonfrillo, M., Nicotera, G., Sica, L., and De Braud, F. (2015). Phospho-TCTP as a therapeutic target of Dihydroartemisinin for aggressive breast cancer cells. *Oncotarget, 6*(7), 5275.

197. Zhang, F., Ma, Q., Xu, Z., Liang, H., Li, H., Ye, Y., Xiang, S., Zhang, Y., Jiang, L., and Hu, Y. (2017). Dihydroartemisinin inhibits TCTP-dependent metastasis in gallbladder cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 36*(1), 68.

198. Lukenbill, J., and Kalaycio, M. (2013). Fludarabine: a review of the clear benefits and potential harms. *Leukemia research, 37*(9), 986-994.

199. Ricci, F., Tedeschi, A., Morra, E., and Montillo, M. (2009). Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Therapeutics and Clinical Risk Management, 5*(1), 187-207.

200. Gandhi, V., and Plunkett, W. (2002). Cellular and clinical pharmacology of fludarabine. *Clinical Pharmacokinetics, 41*(2), 93-103.

201. Zaja, F., Mian, M., Volpetti, S., Visco, C., Sissa, C., Nichele, I., Castelli, M., Ambrosetti, A., Puglisi, S., Fanin, R., Cortelazzo, S., Pizzolo, G., Trentin, L., Rodeghiero, F., Paolini, R., Vivaldi, P., Sancetta, R., Isola, M., and Semenzato, G. (2013). Bendamustine in chronic lymphocytic leukemia: outcome according to different clinical and biological prognostic factors in the everyday clinical practice. *American Journal of Hematology, 88*(11), 955-960.

202. Keating, M. J., Kantarjian, H., Talpaz, M., Redman, J., Koller, C., Barlogie, B., Velasquez, W., Plunkett, W., Freireich, E. J., and McCredie, K. B. (1989). Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood, 74*(1), 19-25.

203. Montgomery, J. A., and Hewson, K. (1969). Nucleosides of 2-fluoroadenine. *Journal of Medicinal Chemistry, 12*(3), 498-504.

204. Lanemo Myhrinder, A., Hellqvist, E., Bergh, A. C., Jansson, M., Nilsson, K., Hultman, P., Jonasson, J., Buhl, A. M., Bredo Pedersen, L., Jurlander, J., Klein, E., Weit, N., Herling, M., Rosenquist, R., and Rosen, A. (2013). Molecular characterization of neoplastic and normal "sister" lymphoblastoid B-cell lines from chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma, 54*(8), 1769-1779.

205. Kale, J., Osterlund, E. J., and Andrews, D. W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation, 25*(1), 65.

206. Dikmen, M. (2017). Aprepitantın İnsan Glioblastoma U87MG Hücreleri üzerinde Antiproliferatif ve Apoptotik Etkileri. *Marmara Pharmaceutical Journal, 21*, 156-164.

207. Sharma, S., and Rai, K. R. (2019). Chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment: So many choices, such great options. *Cancer*, 125(9),1432-1440.

208. Cory, S., and Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer, 2*(9), 647-656.

209. Lorand-Metze, I., Duarte, G., and Metze, K. (2016). Imbalance between proliferation and in vitro apoptosis rates predicts progression in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B Clinical Cytometry,* 90(6), 484-485.

210. Li, Y., and Wu, Y. L. (1998). How Chinese scientists discovered qinghaosu (artemisinin) and developed its derivatives? What are the future perspectives? *Med Trop (Mars), 58*(3), 9-12.

211. Sun, Q., Teong, B., Chen, I. F., Chang, S. J., Gao, J., and Kuo, S. M. (2014). Enhanced apoptotic effects of dihydroartemisinin-aggregated gelatin and hyaluronan nanoparticles on human lung cancer cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 102*(3), 455-462.

212. Lu, M., Sun, L., Zhou, J., Zhao, Y., and Deng, X. (2015). Dihydroartemisinin-induced apoptosis is associated with inhibition of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase activity in colorectal cancer. *Cell Biochemistry and Biophysics, 73*(1), 137-145.

213. Xu, G., Zou, W. Q., Du, S. J., Wu, M. J., Xiang, T. X., and Luo, Z. G. (2016). Mechanism of dihydroartemisinin-induced apoptosis in prostate cancer PC3 cells: An iTRAQ-based proteomic analysis. *Life Sciences, 157*, 1-11.

214. Jia, G., Kong, R., Ma, Z. B., Han, B., Wang, Y. W., Pan, S. H., Li, Y. H., and Sun, B. (2014). The activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase is required for dihydroartemisinin-induced autophagy in pancreatic cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 33*, 8.

215. Im, E., Yeo, C., Lee, H. J., and Lee, E. O. (2018). Dihydroartemisinin induced caspase-dependent apoptosis through inhibiting the specificity protein 1 pathway in hepatocellular carcinoma SK-Hep-1 cells. *Life Sciences, 192*, 286-292.

216. Cao, J. T., Mo, H. M., Wang, Y., Zhao, K., Zhang, T. T., Wang, C. Q., Xu, K. L., and Han, Z. H. (2018). Dihydroartemisinin-induced apoptosis in human acute monocytic leukemia cells. *Oncology Letters, 15*(3), 3178-3184.

217. Park, J., Lai, H. C., Singh, M., Sasaki, T., and Singh, N. P. (2014). Development of a dihydroartemisinin-resistant Molt-4 leukemia cell line. *Anticancer Research, 34*(6), 2807-2810.

218. Wang, Q., Wu, S., Zhao, X., Zhao, C., Zhao, H., and Huo, L. (2015). Mechanisms of Dihydroartemisinin and Dihydroartemisinin/holotransferrin cytotoxicity in T-cell lymphoma cells. *PLoS One, 10*(10), e0137331.

219. Yao, Z., Bhandari, A., Wang, Y., Pan, Y., Yang, F., Chen, R., Xia, E., and Wang, O. (2018). Dihydroartemisinin potentiates antitumor activity of 5-fluorouracil against a resistant colorectal cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 501*(3), 636-642.

220. Tai, X., Cai, X. B., Zhang, Z., and Wei, R. (2016). In vitro and in vivo inhibition of tumor cell viability by combined dihydroartemisinin and doxorubicin treatment, and the underlying mechanism. *Oncology Letters, 12*(5), 3701-3706.

221. Du, S., Xu, G., Zou, W., Xiang, T., and Luo, Z. (2017). Effect of dihydroartemisinin on UHRF1 gene expression in human prostate cancer PC-3 cells. *Anticancer Drugs, 28*(4), 384-391.

222. Feng, X., Li, L., Jiang, H., Jiang, K., Jin, Y., and Zheng, J. (2014). Dihydroartemisinin potentiates the anticancer effect of cisplatin via mTOR inhibition in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: involvement of apoptosis and autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 444*(3), 376-381.

223. Chan, H. W., Singh, N. P., and Lai, H. C. (2013). Cytotoxicity of dihydroartemisinin toward Molt-4 cells attenuated by N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone and deferoxamine. *Anticancer Research, 33*(10), 4389-4393.

224. Li, X., Zhou, Y., Liu, Y., Zhang, X., Chen, T., Chen, K., Ba, Q., Li, J., Liu, H., and Wang, H. (2016). Preclinical Efficacy and Safety Assessment of Artemisinin-Chemotherapeutic Agent Conjugates for Ovarian Cancer. *EBioMedicine, 14*, 44-54.

225. Isoldi, M. C., Visconti, M. A., and Castrucci, A. M. (2005). Anti-cancer drugs: molecular mechanisms of action. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 5*(7), 685-695.

226. Tam, C. S., and Stilgenbauer, S. (2015). How best to manage patients with chronic lymphocytic leuekmia with 17p deletion and/or TP53 mutation? *Leukemia & Lymphoma, 56*(3), 587-593.

227. Badoux, X. C., Keating, M., O'Brien, S., Ferrajoli, A., Burger, J. A., Faderl, S., Garcia-Manero, G., Kadia, T., Abruzzo, L. V., and Wierda, W. G. (2009). Patients with Relapsed CLL and 17p Deletion by FISH Have Very Poor Survival Outcomes. *Blood, 114* (22), 1248.

228. Zenz, T., Häbe, S., Denzel, T., Mohr, J., Winkler, D., Bühler, A., Sarno, A., Groner, S., Mertens, D., and Busch, R. (2009). Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood, 114*(13), 2589-2597.

229. Turgut, B., Vural, O., Pala, F. S., Pamuk, G. E., Tabakcioglu, K., Demir, M., Ongoren, S., Soysal, T., and Algunes, C. (2007). 17p Deletion is associated with resistance of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells to in vitro fludarabine-induced apoptosis. *Leukemia & Lymphoma, 48*(2), 311-320.

230. Sandoval-Sus, J. D., Dalia, S., Talati, C., Shah, B. D., Bello, C. M., Lancet, J. E., Chervenick, P. A., Locke, F. L., Kharfan-Dabaja, M., and Sotomayor, E. M. (2016). Impact of IgVH mutational status in patients with chronic lymphocytic leukemia with isolated good and intermidiate risk genetic aberrations. *Journal of Clinical Oncology* [Abstract], 7534.

231. Gladstone, D. E., Swinnen, L. J., Gocke, C., Blackford, A., Griffin, C. A., and Jones, R. J. (2010). IgVH Mutational Status Is Prognostic In 13q Deletion (del) Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), *Blood, 116*(21), 2419.

232. Gao, X., Luo, Z., Xiang, T., Wang, K., Li, J., and Wang, P. (2011). Dihydroartemisinin induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in HepG2 human hepatoma cells. *Tumori, 97*(6), 771-780.

233. Zhao, J., Pan, Y., Li, X., Zhang, X., Xue, Y., Wang, T., Zhao, S., and Hou, Y. (2017). Dihydroartemisinin and curcumin synergistically induce apoptosis in SKOV3 cells via upregulation of MiR-124 targeting midkine. *Cellular Physiology and Biochemistry, 43*(2), 589-601.

234. Wu, G. S., Lu, J. J., Guo, J. J., Huang, M. Q., Gan, L., Chen, X. P., and Wang, Y. T. (2013). Synergistic anti-cancer activity of the combination of dihydroartemisinin and doxorubicin in breast cancer cells. *Pharmacological Reports, 65*(2), 453-459.

235. Zaman, S., Wang, R., and Gandhi, V. (2014). Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leukemia & lymphoma, 55*(9), 1980-1992.

236. Hu, W., and Kavanagh, J. J. (2003). Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *The Lancet Oncology, 4*(12), 721-729.

237. Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature, 407*(6805), 770.

238. Reed, J. C. (2002). Apoptosis-based therapies. *Nature Reviews Drug Discovery, 1*(2), 111.

239. Pfeffer, C., and Singh, A. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences, 19*(2), 448.

240. Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development, 13*(15), 1899-1911.

241. Kelly, P. N., and Strasser, A. (2011). The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death And Differentiation, 18*(9), 1414.

242. Bommer, U. A. (2017). The Translational Controlled Tumour Protein TCTP: Biological Functions and Regulation. In A. Telerman, Amson, R. (Ed.), *TCTP/tpt1 - Remodeling Signaling from Stem Cell to Disease* (pp. 69-126). Springer.

243. Hou, J., Wang, D., Zhang, R., and Wang, H. (2008). Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: in vitro and in vivo activity, chemosensitization, and mechanisms of action. *Clinical Cancer Research, 14*(17), 5519-5530.

244. Du, X. X., Li, Y. J., Wu, C. L., Zhou, J. H., Han, Y., Sui, H., Wei, X. L., Liu, L., Huang, P., Yuan, H. H., Zhang, T. T., Zhang, W. J., Xie, R., Lang, X. H., Jia, D. X., and Bai, Y. X. (2013). Initiation of apoptosis, cell cycle arrest and autophagy of esophageal cancer cells by dihydroartemisinin. *Biomedicine and Pharmacotherapy, 67*(5), 417-424.

245. Zhao, X., Zhong, H., Wang, R., Liu, D., Waxman, S., Zhao, L., and Jing, Y. (2015). Dihydroartemisinin and its derivative induce apoptosis in acute myeloid leukemia through Noxa-mediated pathway requiring iron and endoperoxide moiety. *Oncotarget, 6*(8), 5582-5596.

246. Chen, J., Zhang, L., and Hao, M. (2018). Effect of artemisinin on proliferation and apoptosis-related protein expression in vivo and in vitro. *Saudi Journal of Biological Sciences, 25*(7), 1488-1493.

247. Chen, H., Sun, B., Pan, S., Jiang, H., and Sun, X. (2009). Dihydroartemisinin inhibits growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs, 20*(2), 131-40.

248. Portier, B. P., and Taglialatela, G. (2006). Bcl-2 localized at the nuclear compartment induces apoptosis after transient overexpression. *Journal of Biological Chemistry, 281*(52), 40493-40502.

249. Vucicevic, K., Jakovljevic, V., Colovic, N., Tosic, N., Kostic, T., Glumac, I., Pavlovic, S., Karan-Djurasevic, T., and Colovic, M. (2016). Association of bax expression and bcl2/bax ratio with clinical and molecular prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Medical Biochemistry, 35*(2), 150-157.

250. Liu, Z., Ding, Y., Ye, N., Wild, C., Chen, H., and Zhou, J. (2016). Direct activation of Bax protein for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews, 36*(2), 313-341.

251. Bommer, U.-A., Vine, K. L., Puri, P., Engel, M., Belfiore, L., Fildes, K., Batterham, M., Lochhead, A., and Aghmesheh, M. (2017). Translationally controlled tumour protein TCTP is induced early in human colorectal tumours and contributes to the resistance of HCT116 colon cancer cells to 5-FU and oxaliplatin. *Cell Communication and Signaling, 15*(1), 9.

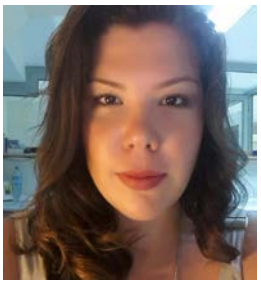
252. Liu, L. K., Wu, H. F., Guo, Z. R., Chen, X. J., Yang, D., Shu, Y. Q., and Zhang, J. N. (2014). Targeted efficacy of dihydroartemisinin for translationally controlled protein expression in a lung cancer model. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 15*(6), 2511-2515.

253. Faria, J. R. d., Yamamoto, M., Faria, R. M. D. d., Kerbauy, J., and Oliveira, J. S. R. d. (2006). Fludarabine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia-the role of P53, Bcl-2, Bax, Mcl-1, and Bag-1 proteins. *Brazilian journal of medical and biological research, 39*(3), 327-333.

254. Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J. M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H.-G., Zhang, X., Bullrich, F., and Croce, C. M. (1998). Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood, 91*(9), 3379-3389.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler



Soyadı, adı : GÖKÇEN Sanem

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 18.04.1980 / ANKARA

Medeni hali : Bekar

Telefon : +90 530 456 17 85

e-mail : sanemgokcen @hotmail.com

Eğitim Derecesi	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet Tarihi**
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü / İmmünoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2005
Lisans	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi / Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	2002

İş Deneyimi

Yıl	**Yer**	**Görev**
2009-devam ediyor	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi / Erişkin Hematoloji BD / Moleküler Hematoloji Laboratuvarı	Öğretim Görevlisi

Yayınlar

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

Berke, M.İ., Yegin, Z.A., Gökçen, S., Özkurt, Z.N. ve Yağcı, M. (2019) Prognostic Significance of Serum BAFF, APRIL, TACI and BCMA Levels in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, *35*(2), 265-271.

Silan, C., Uzun, O., Comunoğlu, N.U., Gokçen, S., Bedirhan, S. ve Cengiz, M. (2007). Gentamicin induced nephrotoxicity in rats ameliorated and healing effects of resveratrol. *Biological and Pharmaceutical Bulletin, 30*(1), 79-83.

Yegin, Z.A, Pepeler, M.S., Kayhan, H., Kosebiyikoglu, H., Gokcen, S. Kaynar, L.A. ve Yagci, M. (2019) Cytoplasmic Nucleolin Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *International Journal of Hematology and Oncology*, *29*(1), 261-264.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

Berke, M.İ., Yegin, Z.A., Gökçen, S., Özkurt, Z.N. ve Yağcı, M. (2017) Prognostic Significance of Serum BAFF, APRIL, TACI and BCMA Levels in Chronic Lymphocytic Leukemia. 22nd Congress of the European Hematology Association Madrid, Spain, June 22–25, 2017. Haematologica.

C. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

Gökçen S., Cengiz, M. ve Özaydın, A. (2013) Tip 2 Diyabetli Hastalarda Serum Paraoksonaz Düzeyleri ve PON1(192) Polimorfizmi. *Gazi Medical Journal*, *24*(3), 70-73.

D. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

Canseven, A.G., Esmekaya, M.A., Gökçen S., Yağcı, M. ve Seyhan, N. (2012/25-28 Eylül). *24. Ulusal Biyofizik Kongresi, "UV-B Radyasyon Uygulamasının İnsan Kan Lenfositlerinde Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi"*, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi.

Çakmak, G., Kayhan, H., Gökçen, S., Özkurt, Z.N., Yegin, Z.A., Haznedar, R. ve Yagci, A.M. (2017/1-4 Kasım.). *"Esansiyel Trombositoz ve Primer Myelofibrozisli Hastalarda Kalretikülin Mutasyonu ve Kemik İliği Fibrozisi İlişkisi"*. 43. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya.

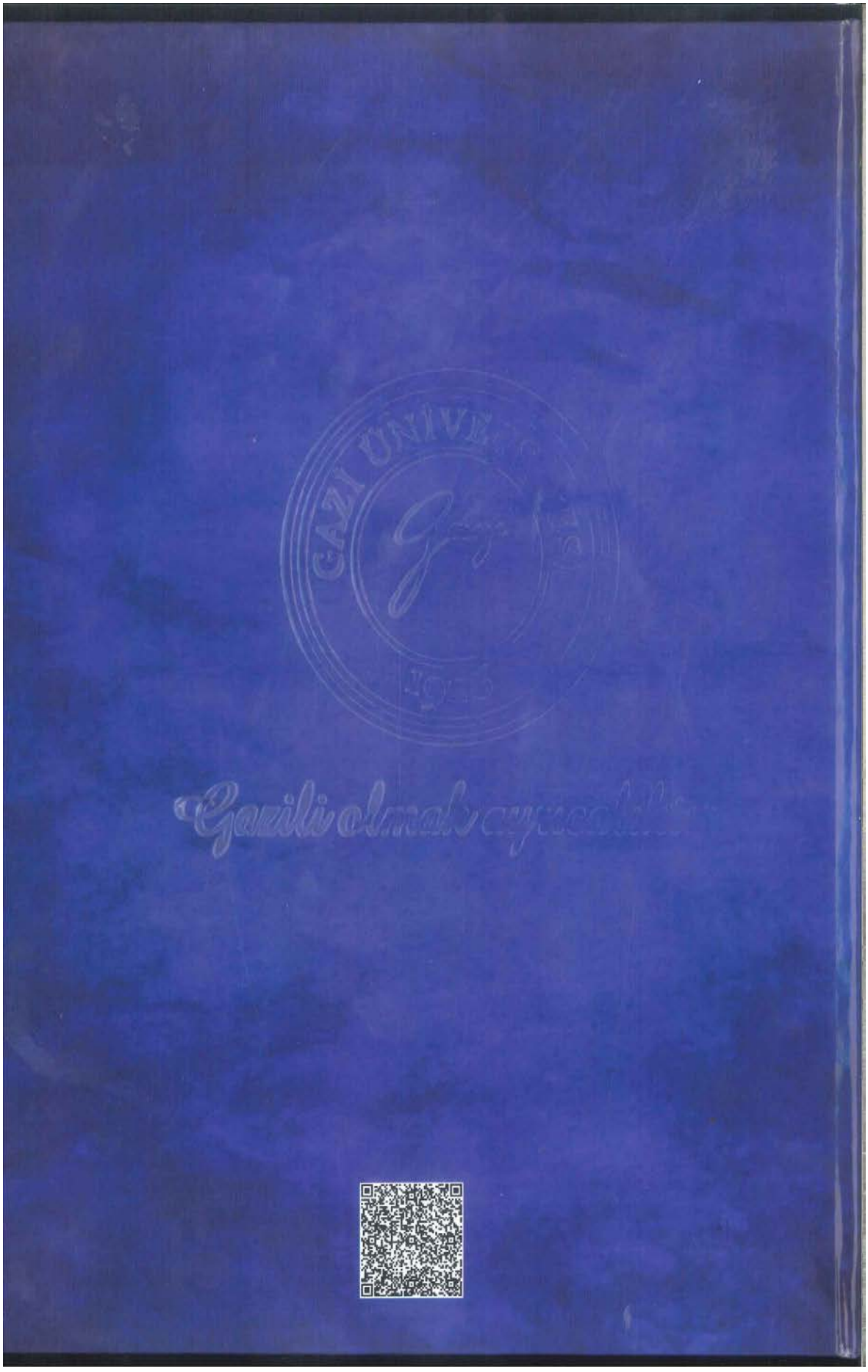
Gökçen, S. ve Cengiz, M. (2005/24-27 Kasım). *IX. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, "Tip 2 Diabetli Hastalarda Serum Paraoksonaz Düzeyleri ve PON1(192) Polimorfizmi"*, Manisa Anemon Hotel.

Kayhan, H., Yağcı, M., Sunguroğlu, A., Gökçen, S., Kızılkaya, C. 23. Ulusal İmmünoloji Kongresi, (2015/26-30 Nisan). *"Kronik Lenfositik Lösemide TCTP/HRF ve MCL-1 İfadelenmesi"*, Titanic Lara Hotel, Antalya.

Özkurt, Z.N., Gökçen S., Pepeler, S., Kaya, A., Yegin, Z.A. Kayhan, H., Yağcı, M. 24. Ulusal İmmünoloji Kongresi, (2017/ 27-30 Nisan). *"Akut promyelositik lösemi (AML-M3)'de NPM1 ve FLT3 gen mutasyonlarının sıklığı",* İstanbul Üniversitesi Kongre ve Kültür Merkezi.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR…


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazili olmak ayrıcalıktır